

**Herstellung chimärer Rezeptoren zur tumorspezifischen Armierung
polyklonaler, zytotoxischer T-Lymphozyten**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

eingereicht an der
Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden

von

Agnieszka Morgenroth

geboren am 14.10.1974 in Jezowe

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. habil. Gerhard Rödel
 2. Prof. Dr. med. habil. E. Peter Rieber
 3. Prof. Dr. rer. nat. habil. Elisabeth Weiss

Tag der Einreichung: 22.09.2005

Tag der Disputation: 07.12.2005

Verzeichnis der wissenschaftlichen Veröffentlichungen

Temme, A., Morgenroth, A., Schmitz, M., Weigle, B., Rohayem, J., Lindemann, D., Fussel, M., Ehninger, G. & Rieber, E.P. (2002)

Efficient transduction and long-term retroviral expression of the melanoma-associated tumor antigen tyrosinase in CD34 (+) cord blood-derived dendritic cells.
Gene Therapy, **22**, 1551-1560.

Temme, A., Diestelkoetter-Bachert, P., Schmitz, M., Morgenroth, A., Weigle, B., Rieger, M.A., Kiessling, A. & Rieber, E.P. (2005)

Increased p21 (ras) activity in human fibroblasts transduced with survivin enhances cell proliferation.
Biochemical and Biophysical Research Communications, **3**, 765-773.

Temme, A., Herzig, E., Weigle, B., Morgenroth, A., Schmitz, M., Kiessling, A., Rieger, M.A., Schackert, H.K. & Rieber, E.P. (2005)

Inhibition of malignant glioma cell growth by a survivin mutant retrovirus.
Human Gene Therapy, **2**, 209-222.

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Adjuvante Immuntherapien von Krebserkrankungen	1
1.1.1.	Auf T-Zellen basierende Immuntherapie von Krebserkrankungen.....	1
1.1.2.	Antikörper-Therapie von Krebserkrankungen	7
1.1.2.1.	Bereits in der Tumorthherapie eingesetzte Antikörper	9
1.1.3.	Immuntherapie mit genetisch modifizierten zytotoxischen T-Zellen.....	12
1.1.3.1.	Molekulare Struktur von chimären Rezeptoren	13
1.1.3.2.	Modifizierung von T-Zellen mit chimären Rezeptoren	16
1.2.	Prostatakarzinom	20
1.2.1.	Das prostataspezifische Stammzellantigen (PSCA) als Ziel einer adjuvanten Immuntherapie	21
1.3.	Zielsetzung	24
2.	MATERIAL UND METHODEN	26
2.1.	Material.....	26
2.1.1.	Chemikalien	26
2.1.2.	Lösungen und Puffer.....	26
2.1.3.	Kulturmedien	28
2.1.4.	Zelllinien	28
2.2.	Molekularbiologische Methoden	30
2.2.1.	Isolierung der Gesamt-RNA	30
2.2.2.	Reverse Transkription von mRNA.....	30
2.2.3.	Polymerase-Ketten-Reaktion	31
2.2.4.	Klonierung von PCR-Produkten und von DNA-Fragmenten nach einem enzymatischen Verdau	32
2.2.5.	Restriktionsverdau von DNA	32
2.2.6.	Modifizierung von DNA-Fragmenten.....	32
2.2.7.	Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren	33
2.2.8.	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	33
2.2.9.	Transformation kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien nach Hanahan (1983) [101]	34
2.2.10.	Plasmidminipräparation aus <i>E.coli</i> nach Holmes & Quigley [102]	34
2.2.11.	Plasmidmaxipräparation aus <i>E.coli</i>	34
2.2.12.	Sequenzierung von Nukleinsäuren	35
2.2.13.	Generierung von neuen DNA-Konstrukten	35
2.2.13.1.	Klonierung der variablen Domäne V _H einer schweren IgG1-Kette	35
2.2.13.2.	Klonierung der variablen Domäne V _L einer leichten IgG1-Kette	36
2.2.13.3.	Klonierung der hFL (humaner „full length“) -BetaC2-Kette.....	36
2.2.13.4.	Generierung des chimären AMI-BetaC2 Konstruktes	37

2.2.13.5.	Generierung des chimären AMI-BetaC-CD3 Zeta-Konstruktes	37
2.2.13.6.	Klonierung der hFL (humaner „full length“) -CD28-Kette.....	38
2.2.13.7.	Generierung des chimären AMI-CD28-Konstruktes	38
2.2.13.8.	Generierung von löslichem PSCA	39
2.2.14.	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese.....	39
2.2.15.	Western Blot und immunchemischer Nachweis.....	40
2.2.15.1.	Phospho-Akt und Akt Nachweis mittels Western Blot	41
2.2.15.2.	Phospho-Zeta-Kette Nachweis mittels Western Blot.....	41
2.2.16.	Metallchelatchromatographie	42
2.3.	Zellbiologische Methoden	43
2.3.1.	Bestimmung der Zellzahl	43
2.3.2.	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	43
2.3.3.	Kultivierung und Passagieren von Zelllinien	44
2.3.4.	Transfektion von Zelllinien und Generierung stabiler Klone.....	44
2.3.5.	Transduktion von humanen Zelllinien	45
2.3.6.	Generierung monoklonaler Antikörper	47
2.3.7.	Isotypbestimmung monoklonaler Antikörper mittels ELISA	47
2.3.8.	Oberflächen- und intrazelluläre-Zellfärbungen.....	48
2.3.9.	Bindung von löslichem „AMI“ (sAMI) an die PSCA-positiven Zellen.....	49
2.3.10.	Bindung von löslichem PSCA (sPSCA) an den chimären Rezeptor	49
2.3.11.	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse).....	50
3	ERGEBNISSE	51
3.1	Generierung eines neuen hochaffinen monoklonalen Antikörpers gegen die extrazelluläre Domäne von PSCA.....	51
3.1.1	Transfektion von P815-Zellen mit pPSCA-IRES2-EGFP-Vektor	51
3.1.2	Immunisierung von C3H x Balb/c F1-Mäusen mit P815 PSCA-positiven Zellen und Hybridom-Screening	52
3.2	Generierung eines anti-PSCA Einzelketten-Antikörpers (scFv)	55
3.2.1	Klonierung der variablen Regionen des anti-PSCA Antikörpers	55
3.2.2	Konstruktion eines anti-PSCA Einzelkettenantikörpers	57
3.2.3.	Expression des anti-PSCA scFv „AMI“ im eukaryotischen System	60
3.3.	Herstellung von löslichem PSCA (sPSCA)	64
3.3.1.	Konstruktion eines eukaryotischen Vektors zur Herstellung von löslichem PSCA	64
3.3.2.	Herstellung von rekombinanten PSCA in einem eukaryotischen System.....	65
3.4.	Generierung von chimären Rezeptoren.....	68
3.4.1.	Konstruktion eines chimären T-Zell-Beta-Rezeptors	68
3.4.1.1.	Der chimäre AMI-BetaC2-Rezeptor.....	68

3.4.1.2.	Der chimäre AMI-BetaC-CD3 Zeta-Rezeptor	74
3.4.2.	Konstruktion eines chimären CD28-Rezeptors	77
3.5.	Stimulation der Zellen über die chimären AMI-Rezeptoren	84
3.5.1.	Stimulation der Zellen über den chimären AMI-BetaC-CD3 Zeta-Rezeptor	84
3.5.2.	Stimulation der Zellen über den chimären AMI-CD28-Rezeptor	87
4.	DISKUSSION.....	90
4.1.	Generierung eines neuen starkreaktiven monoklonalen PSCA-spezifischen Antikörpers	90
4.2.	Mögliche therapeutische Verwendung des neuen PSCA-spezifischen 7F5 Antikörpers	91
4.3.	Isolierung der variablen Domänen des 7F5 Antikörpers.....	92
4.4.	Generierung eines PSCA-spezifischen Einzelkettenantikörpers	95
4.5.	Funktionalität des Einzelkettenantikörpers „AMI“	96
4.6.	Mögliche therapeutische Verwendung des Einzelketten-antikörpers „AMI“	97
4.7.	Herstellung von löslichem PSCA (sPSCA)	98
4.8.	Generierung von chimären T-Zell-Rezeptoren	99
4.8.1.	T-Zell-Rezeptor Beta-Kette als chimäres Konstrukt.....	99
4.8.2.	Chimärer auf der CD3 ζ -Kette-basierender T-Zell-Rezeptor	102
4.9.	Kostimulatorischer AMI-CD28-Rezeptor	104
4.10.	Funktionalität der chimären AMI-Rezeptoren.....	106
4.11.	Ausblick: Zytotoxische Aktivität und anhaltende Proliferation als Ergebnis der Modifizierung der humanen T Zellen mit chimären Rezeptoren.....	110
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	112
6.	LITERATURVERZEICHNIS.....	115
7.	ANHANG	134
7.1.	Vektorkarten	134
7.2.	<i>IgBlast</i> Datenbank-Analyse	138
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....		IV

Abkürzungsverzeichnis

ADCC	Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AML	Akute myeloblastische Leukämie
APC	Antigen-präsentierende Zelle
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
CD	„Cluster of differentiation“
CDC	Komplement-vermittelte Zytotoxizität
cDNA	kodierende DNA
CDR	„complementarity determining region“
CEA	“carcinoembryonic antigen”
CH Domäne	konstante schwere Domäne
chTCR	chimärer T-Zell-Rezeptor
CL Domäne	konstante leichte Domäne
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CMV	Cytomegalie-Virus
CR	Komplementrezeptor
CRC	“colorectal cancer”
C-terminal	carboxyterminal
CTL	zytotoxische T Zellen
Cy3	Indocarbocyanin
DC	Dendritische Zelle
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	„enhanced chemiluminescence“

EGFP	„enhanced green fluorescence protein“
ELISA	„Enzyme linked immunosorbent assay“
EpCam	„epithelial cell adhesion molecule“
ERBB2	„erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2“
ER	endoplasmatisches Retikulum
Fab	Antigen-bindendes Fragment
FACS	„fluorescence activated cell sorter“
FBP	„folate-binding protein“
Fc	konstantes Fragment
Fc γ R	Fc γ -Rezeptor
FI	Fluoreszenzintensität
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
fl	„full length“, Gesamtlängen-
FR	„framework region“
Fv	variables Fragment
g	Zentrifugalbeschleunigung
gp75	Glykoprotein, 75 kDa
gp100	Glykoprotein, 100 kDa
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
h	Stunde
HAMA	humane anti-Maus Antikörper
HER2	humaner epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor 2
H-Kette	„heavy“, schwere Kette
HLA	„human leukocyte antigen“
HRP	Meerrettich-Peroxidase
HV-Region	hypervariables Region
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRES	interne Ribosomenbindungsstelle
ITAM	„immunreceptor tyrosine-based activations motif“
i.v.	intravenös
kb	Kilobasen

kDa	Kilodalton
LAK-Zellen	Lymphokin-aktivierte Killerzellen
L-Kette	„light“, leichte Kette
LTR	„long terminal repeat“
LV	Leer Vektor
mAk	Monoklonaler Antikörper
MART-1	„melanoma antigen recognized by T cells 1“
MCS	multiple Klonierungsstelle
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	„major histocompatibility complex“
min	Minuten
MoMuLV	„ <i>Moloney murine leukaemia virus</i> “
MW	Molekulargewicht
NHL	„non Hodgkin lymphom“
NF κ B	Nukleärer Faktor-kappaB
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NSCLC	„non small cell lung cancer“
N-terminal	aminoterminal
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAP	prostataspezifische saure Phosphatase
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PI	Propidium-Iodid
PBMC	periphere Blut-mononukleäre Zellen
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PI 3-K	Phosphoinositol 3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PrLZ	„prostate leucine zipper“
PSA	prostataspezifisches Antigen
PSCA	prostataspezifisches Stammzellantigen
RT	Raumtemperatur
sAMI	„soluble“, lösliches AMI
scFv	„single chain antibody“

SDS	Natriumlaurylsulfat
sPSCA	“soluble”, lösliches PSCA
TAA	tumorassoziiertes Antigen
TCR	T-Zell-Rezeptor
TIL	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
TNF	Tumornekrosefaktor
U	„Unit“, Einheit
VEGF	“vascular endothelial growth factor”
VSV	vesikulärer Stomatitis Virus
wt	Wildtyp
ZAP-70	Zeta-assoziiertes Protein 70 kDa

1. Einleitung

Im Laufe des letzten Jahrhunderts wurde die Hypothese, dass das Immunsystem in der Lage ist, maligne transformierte Zellen aufzuspüren und zu zerstören („immune surveillance“), mehrfach aufgestellt [1, 2, 3]. Erst in den letzten Jahren ist es gelungen experimentell nachzuweisen, dass das Immunsystem fähig ist, die im Rahmen der Tumorgenese entstehenden und exprimierten Antigene, die als tumorassoziierte Antigene (TAA) bezeichnet werden, spezifisch zu erkennen und dagegen zu reagieren [4, 5, 6]. Es können sowohl Antikörper gegen die TAA gebildet werden, als auch spezifische Effektor-T-Zellen aktiviert werden. Dies konnte bei einer Vielzahl von Tumorpatienten nachgewiesen werden. Häufig scheint jedoch die natürliche anti-Tumor Reaktion nicht effektiv genug zu sein. Eine Strategie besteht daher darin, die konventionellen Formen der Tumorthherapie, wie Chirurgie, Chemotherapie und Bestrahlung, durch adjuvante gezielte Aktivierung immunologischer Abwehrmechanismen gegen Tumorzellen in Patienten zu unterstützen. Die derzeitigen Strategien der adjuvanten Immuntherapie von Tumoren bestehen einerseits in der Aktivierung zytotoxischer T-Zellen, die Tumorzellen spezifisch erkennen und lysieren können, und andererseits in der Behandlung mit monoklonalen Antikörpern, die gegen das native TAA gerichtet sind.

1.1. Adjuvante Immuntherapien von Krebserkrankungen

1.1.1. Auf T-Zellen basierende Immuntherapie von Krebserkrankungen

Die adjuvante auf T-Zellen basierende Therapie von Tumoren stellt eine Form der passiven Immunisierung dar. Im Rahmen einer solchen Therapie werden den Tumorpatienten autologe Tumor-reaktive Immunzellen verabreicht. Der dabei ausgelöste Zell-vermittelte therapeutische Effekt ist auf die zytotoxische Aktivität und die Freisetzung von Zytokinen, die andere Effektorzellen wie Monozyten und Granulozyten rekrutieren und aktivieren, zurückzuführen. In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche Versuche unternommen, um Tumor-reaktive Zellen zu isolieren und zu expandieren [7, 8]. Durch die Kultivierung der peripheren Blutleukozyten von Krebspatienten mit Interleukin 2 (IL2) ist es gelungen, zytotoxische Effektorzellen zu gene-

rieren, die in der Lage waren die autologen Tumorzellen zu lysieren [9]. Diese neue Zellpopulation, bekannt unter dem Namen Lymphokin-aktivierte Killerzellen (LAK-Zellen), repräsentiert ein zytotoxisches System, das sich von den bekannten NK- und zytotoxischen T-Zellen unterscheidet [10]. Die LAK-Zellen gehören zu einer Subpopulation von „Null“-Lymphozyten, die weder die typischen T-Zell- noch NK-Zell-Oberflächenmarker tragen [11]. LAK-Zellen unterliegen in ihrer Funktion nicht einer MHC-Restriktion und sind somit unabhängig von der MHC-Expression auf Tumorzellen (Abb.1). Im Jahr 1984 beschrieben Mule et al. in einer Studie die Regression von Tumormetastasen im Mausmodell nach Behandlung mit LAK-Zellen kombiniert mit systematischer Administration von rekombinantem IL2 [12]. Die klinische Relevanz einer adaptiven Immuntherapie mit LAK-Zellen in Verbindung mit IL2 wurde in einer Studie von Rosenberg und Mitarbeiter untersucht. Bei den mit LAK-Zellen und IL2 behandelten Patienten mit metastasierenden Tumoren (Nierenzellkarzinom, Melanom, kolorektales Karzinom, Sarcom mit Leber- und Lungenmetastasen), bei denen die konventionellen Therapien erfolglos waren, konnte in 44% der Fälle eine Tumoregression festgestellt werden [13]. Die Rückbildung wurde in histologisch unterschiedlichen Tumortypen beobachtet, was für eine unspezifische lytische Kapazität und eine breite Tumorreaktivität der LAK-Zellen sprach. Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse wurden mehrere klinische Studien mit den LAK-Zellen und IL2 durchgeführt. Einerseits bestätigten diese die vorher beobachtete Regression des Tumors, andererseits zeigten sie auch die negativen Nebenwirkungen und Faktoren, die diese Art von Therapie mit sich brachte und ihre Einsetzbarkeit einschränkte [14, 15, 16].

Im Jahr 1993 stellten Rosenberg et al. Ergebnisse einer umfangreichen randomisierten Studie mit 181 Patienten im fortgeschrittenen Krebsstadium (97 Patienten mit diagnostiziertem Nierenzellkarzinom, 54 mit Melanom, 18 mit kolorektalem Karzinom und 9 mit Non-Hodgkin's Lymphom) vor. Im Rahmen dieser Studie wurden die Ansprech- und Überlebensraten von Patienten nach der Behandlung mit LAK-Zellen und IL2 mit denen von Patienten, die nur mit IL2 therapiert wurden, verglichen. Aus der Behandlung von Melanompatienten mit einer Kombination aus LAK-Zellen und IL2 resultierte eine verlängerte Überlebensrate im Vergleich zur Therapie mit ausschließlich IL2 (24-monatige Überlebensrate: 32% gegen 15%; 48-monatige Überle-

bensrate: 18% gegen 4%). Keine signifikanten Unterschiede konnten in Patienten mit metastasierendem Nierenzellkarzinom festgestellt werden [17]. Eine Problematik, die in den meisten Studien beobachtet wurde, stellten die Nebenwirkungen wie Nekrose, Diarrhöe und Gewichtszunahme dar. Diese wurden hauptsächlich durch die Verabreichung hoher Konzentrationen von exogenem IL2 verursacht.

Die durch mehrere klinische Studien belegte niedrige Ansprechrate bei der Behandlung mit unspezifischen LAK-Zellen und die hohe Toxizität von IL2 führten zum Einsatz von Tumor-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL). Im Gegensatz zu unspezifischen LAK-Zellen exprimieren sie auf ihrer Oberfläche einen klonalen T-Zell-Rezeptor (TCR) mit Bindungsspezifität für ein bestimmtes Zielantigen. Das Antigen wird in Form eines Peptids, das in der Bindungsgrube von MHC-Klasse-I-Molekülen verankert ist, von den T-Zellen über den TCR spezifisch erkannt. Für eine effiziente Aktivierung der naiven T-Zellen sind nach einer weitgehend akzeptierten Modellvorstellung zwei Signale erforderlich [18]. Durch die Bindung des T-Zell-Rezeptors an einen HLA-Peptidkomplex wird das erste Signal erzeugt und das zweite Signal durch die Interaktion von kostimulatorischen Molekülen. Die dendritischen Zellen stellen professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APC) dar, die in der Lage sind, beide Signale gleichzeitig an die T-Zellen zu liefern und diese somit zu aktivieren. Sie werden aufgrund ihrer ausgeprägten Fähigkeiten bei der Aktivierung von T-Zellen für eine potenzielle Verbesserung der oftmals unzureichenden T-Zellantwort gegen den Tumor eingesetzt. Hierfür werden die dendritischen Zellen isoliert und *in vitro* mit Tumorproteinen beladen, die intrazellulär prozessiert und als Komplex mit MHC-Molekülen an der Zelloberfläche den ebenfalls isolierten, autologen T-Zellen präsentiert werden [19]. Als Ergebnis werden T-Zellen expandiert, die eine hohe Spezifität zu dem Tumor aufweisen. In einer Pilotstudie von Meidenbauer et al. wurden acht Melanompatienten mit autologen Melan-A- (Melanom-assoziiertes Antigen) spezifischen CTLs, die durch die Stimulation mit Melan-A-Peptid beladenen dendritischen Zellen generiert wurden, behandelt [20]. Mit Hilfe der Tetramer-Technologie, die die Detektion und Quantifizierung der Ag-spezifischen CTLs ermöglicht, konnten die Melan-A-spezifischen T-Zellen bis zu 14 Tage nach dem adoptiven Transfer im Blut nachgewiesen werden, was auf eine anhaltende Persistenz und Proliferation der T-Zellen hindeutet. Durch eine radioaktive Markierung wurde die Tumorlokalisierung der Melan-A-spezifischen T-Zellen bereits 48h nach der Behandlung demonstriert.

Die Generierung einer ausreichenden Anzahl von dendritischen Zellen für eine T-Zell-Expansion für klinische Zwecke erwies sich jedoch als problematisch und schränkte daher die Einsetzbarkeit dieser Therapieart stark ein. Einen alternativen Weg zur spezifischen *in vivo* T-Zell-Stimulation stellt die Vakzinierung der Patienten mit den von TAA abgeleiteten Peptiden dar. In einer klinischen Studie von Rosenberg et al. konnten gp100- (Melanom-assoziiertes Antigen) reaktive CTLs als Ergebnis einer Immunisierung von Melanompatienten generiert werden [21]. Eine Tumoregression konnte jedoch nur in Einzelfällen erzielt werden. Die geringe Erfolgsrate wurde hauptsächlich auf die unzureichende Anzahl von Tumor-reaktiven, zytotoxischen T-Zellen im peripheren Blut der Patienten zurückgeführt. Daher stellt die Generierung von zytotoxischen T-Effektorzellen, die die Tumorzellen spezifisch erkennen und zerstören können, die wichtigste Voraussetzung für eine erfolgreiche T-Zell-basierende Therapie dar. Um die limitierenden Faktoren auszuschließen, wurden neue Strategien entwickelt. Eine sehr vielversprechende Methode beruht auf der Isolierung und Aktivierung der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL). Dabei werden die T-Zellen, die ins Tumorgewebe eingewandert sind, nach der Entfernung des Primärtumors isoliert und *in vitro* unter Stimulation mit IL2 aktiviert und expandiert (Abb.1). Die lytische Aktivität von TILs ist 50-100 mal höher als die von LAKs [22]. Generell, ist es gelungen TILs von Melanom- [23, 24], Gliom- [25] und Nierenzellkarzinompatienten [26] zu generieren. Hierbei erwies sich diese Behandlungsstrategie in Patienten mit Gliom- und Nierenzellkarzinom als nicht effektiv. Die niedrige Wirkung ist wahrscheinlich einer schwachen Produktion an Tumor-spezifischen CD8⁺ T-Zellen zuzuschreiben [27, 28, 29]. Im Vergleich dazu konnten in 78% der Melanompatienten die Tumor-reaktiven Lymphozyten generiert werden [30].

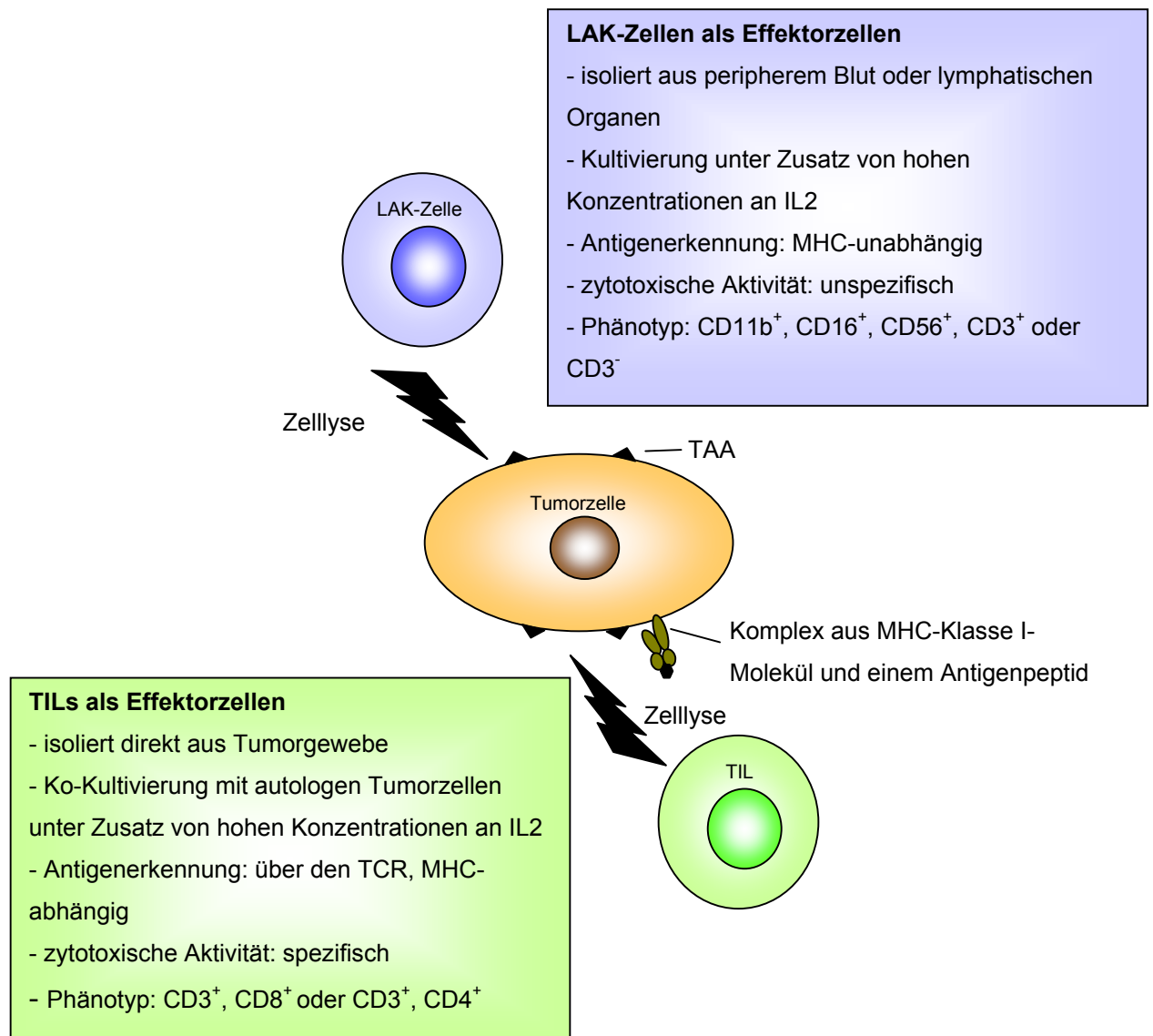


Abb.1 LAK-Zellen und TILs als Effektorzellen einer adjuvanten T-Zell-abhängigen Therapie. Abkürzungen: CD cluster of differentiation; IL2 Interleukin 2; MHC major histocompatibility complex; LAK-Zellen Lymphokin-aktivierte Killerzellen; TAA tumorassoziiertes Antigen; TCR T-Zell-Rezeptor; TIL Tumor-infiltrierende Lymphozyten

Im Jahre 1994 wurde eine umfangreiche Zusammenfassung der ersten klinischen Studie unter Einsatz von TILs und IL2 bei der Behandlung von Melanompatienten publiziert [31]. In 34% der Patienten konnte eine objektive klinische Antwort gegen den Tumor festgestellt werden. Die beobachtete Immunreaktion war in den meisten Fällen transient, was auf die limitierte Persistenz der transferierten Zellen zurückgeführt wurde [32]. Aufgrund von Hinweisen aus zahlreichen klinischen Studien, dass die Suppression des Immunsystems die Effizienz der auf T-Zell-basierenden Therapie deutlich erhöhen kann, wurde die Auswirkung der nicht myeloablativen Chemo-

therapie vor dem T-Zelltransfer untersucht. Die ersten erfolgreichen Ergebnisse wurden im Jahr 2002 von Dudley et al. vorgestellt [33]. Durch den Transfer von MART-1- (Melanom-assoziiertes Antigen) spezifischen T-Zellen in Patienten, die einer nicht myeloablativen lymphodepletierenden Chemotherapie unterzogen wurden, konnte eine Eliminierung der Tumormetastasen in sechs von dreizehn Patienten erreicht werden. Zusätzlich konnte eine lang anhaltende Persistenz der injizierten T-Zellen assoziiert mit einer *in vivo* Proliferation, funktioneller Aktivität und Lokalisierung im Tumor festgestellt werden. Vier Monate nach der Behandlung konnten bis zu 70% der zirkulierenden CD8⁺ T-Zellen als von den transferierten TILs abstammende Tumor-reaktive Klone identifiziert werden. Als unproblematische Nebenwirkung wurde eine Autoimmunreaktion gegen die nicht malignen, MART-1 positiven Melanozyten („Vitiligo“) beobachtet. Diese Studie eröffnet eine neue Möglichkeit zur Behandlung von Patienten mit Tumormetastasen unter Einsatz von „Selbst-Antigenen“ als Zielstruktur der Therapie. Es handelt sich dabei um Differenzierungsantigene, die sowohl auf normalen als auch auf malignen Geweben expri-miert werden. Kriterien, die die Einsetzbarkeit solcher Antigene für Immuntherapien einschränken, sind Tolerierbarkeit und lokale Kontrollierbarkeit der ausgelösten Autoimmunreaktionen. Solche „Selbst Antigene“, die keine überlebenswichtige Funktion haben, sind für verschiedene humane Karzinome wie z. B. Prostata-, Brust-, Ovarial- und Schilddrüsen-Karzinome bekannt und eignen sich als Zielantigen solcher anti-Tumor Therapien.

Die selektive *in vivo* Repopulation der höchst reaktiven Klone aus transferierten Zellen veranlasste klinische Studien unter Verwendung von definierten CD8⁺ Tumor-reaktiven T-Zellklonen. In einer Phase I Studie untersuchten Yee et al. den klinischen Effekt eines adoptiven Zell-Transfers von MART-1- bzw. gp100-spezifischen Klonen in Melanompatienten. Die Frequenz von antigenspezifischen T-Zellen in peripherem Blut und Tumorgewebe wurde mittels Peptid-MHC-Tetrameren und quantitativer PCR analysiert. Bereits zwei Wochen nach der T-Zellinfusion konnten keine MART1- bzw. gp-100-spezifische Klone mehr nachgewiesen werden. Die ausgelöste anti-Tumor Immun-eaktion erwies sich nur teilweise als effektiv (geringe bis gemischte Immunantwort) [34]. Diese Experimente zeigten deutlich, dass die Tumorantigen-Erkennung durch die transferierten T-Zellen zwar notwendig, aber nicht ausreichend für die Induktion einer effektiven Immunantwort ist. Der Bedarf an Tumor reaktiven CD4⁺ T-Zellen [35] und die Erschöpfung der Proliferationskapazität der Zellen während der

klonalen *in vitro* Expansion [36] sind mögliche Ursachen für die fehlende Persistenz der injizierten T-Zellklone.

Zusammenfassend zeigen die bisherigen Ergebnisse, dass ein adoptiver Transfer von aktivierten T-Zellen nur teilweise eine effektive Eliminierung des Tumors in Melanom- und Nierenkarzinompatienten bewirkte [37]. Generell war diese Art der adoptiven Immuntherapie hinsichtlich der Behandlung von häufig vorkommenden Tumorerkrankungen wie Ovarial-, Mamma- und Kolonkarzinom erfolglos. Anhand der durchgeführten Studien konnten 1) Schwierigkeiten bei der Isolierung und Kultivierung ausreichenden Anzahl von zytotoxischen T-Zellen aller Tumortypen, 2) eine ineffiziente Tumorlokalisierung der T-Zellen nach dem adoptiven Zell-Transfer, 3) IL-2-Toxizität und 4) eine schwache Proliferation mit kurzzeitiger Persistenz der transferten T-Zellen im Organismus als limitierende Faktoren der T-Zell-abhängigen Therapie definiert werden.

1.1.2. Antikörper-Therapie von Krebserkrankungen

Köhler und Milstein [38] ermöglichten durch die Entwicklung der Hybridomatechnik im Jahre 1975 die Produktion großer Mengen an murinen monoklonalen Antikörpern (mAk), die in der Lage sind, mit hoher Spezifität tumorassoziierte Antigene auf den Tumorzellen zu erkennen. Es existieren mehrere Möglichkeiten, um Tumorzellen mit Hilfe von Ak anzugreifen. Eine wichtige Effektorpopulation stellen dabei die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) dar, die mit Ak-markierte Tumorzellen erkennen und anschließend lysieren können (ADCC = Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity [39, 40]). Die NK-Zellen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche einen niedrigaffinen Rezeptor ($\text{Fc}\gamma\text{RIII} = \text{CD16}$) zur Bindung der konstanten Domäne (Fc) von IgG1- und IgG3-Antikörpern. Die ADCC wird ausgelöst, wenn die Fc-Rezeptoren auf den NK-Zellen mit den an Tumorzellen gebundenen Ak vernetzt werden. Durch anschließende Freisetzung von Granzymen und Perforinen sowie die Expression von Fas-L (*Fas ligand*) und TRAIL (*Tumour necrosis factor –related apoptosis-inducing ligand*) wird die Zielzelle lysiert. Auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen werden neben dem niedrigaffinen $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ auch andere $\text{Fc}\gamma$ - Rezeptoren mit unterschiedlicher Affinität für Immunglobuline exprimiert: $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ (CD64), $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ (CD32). Die Monozyten und Makrophagen gehören zu den Zellen des mononukleär-phagozytierenden

Systems. Durch die Ak-Bindung an Tumorzellen werden diese opsonisiert, d.h. die „Angreifbarkeit“ der Tumorzellen für die Phagozyten wird gesteigert, und die Phagozytoserate somit erhöht. Die Bedeutung der Fc-Fc γ R-Interaktion für die tumorspezifische Aktivität von Antikörpern *in vivo* wurde zum ersten Mal in einem Mausmodell im Jahre 1998 demonstriert [41]. Im Rahmen dieser Studie wurden Wildtyp (wt) und Fc γ R-defiziente Mäuse mit metastasierendem Melanom mit einem monoklonalen, gp75- (Melanom-assoziiertes Antigen) spezifischen Antikörper immunisiert. Eine effiziente tumorspezifische Immunreaktion wurde nur in wt Mäusen festgestellt. Der Verlust an Fc γ R-Expression führte zum Ausbleiben der ADCC. Dieses Experiment bestätigte die Bedeutung der ADCC als wahrscheinlich wesentlicher Mechanismus in der tumorspezifischen Antikörpertherapie (Abb.2).

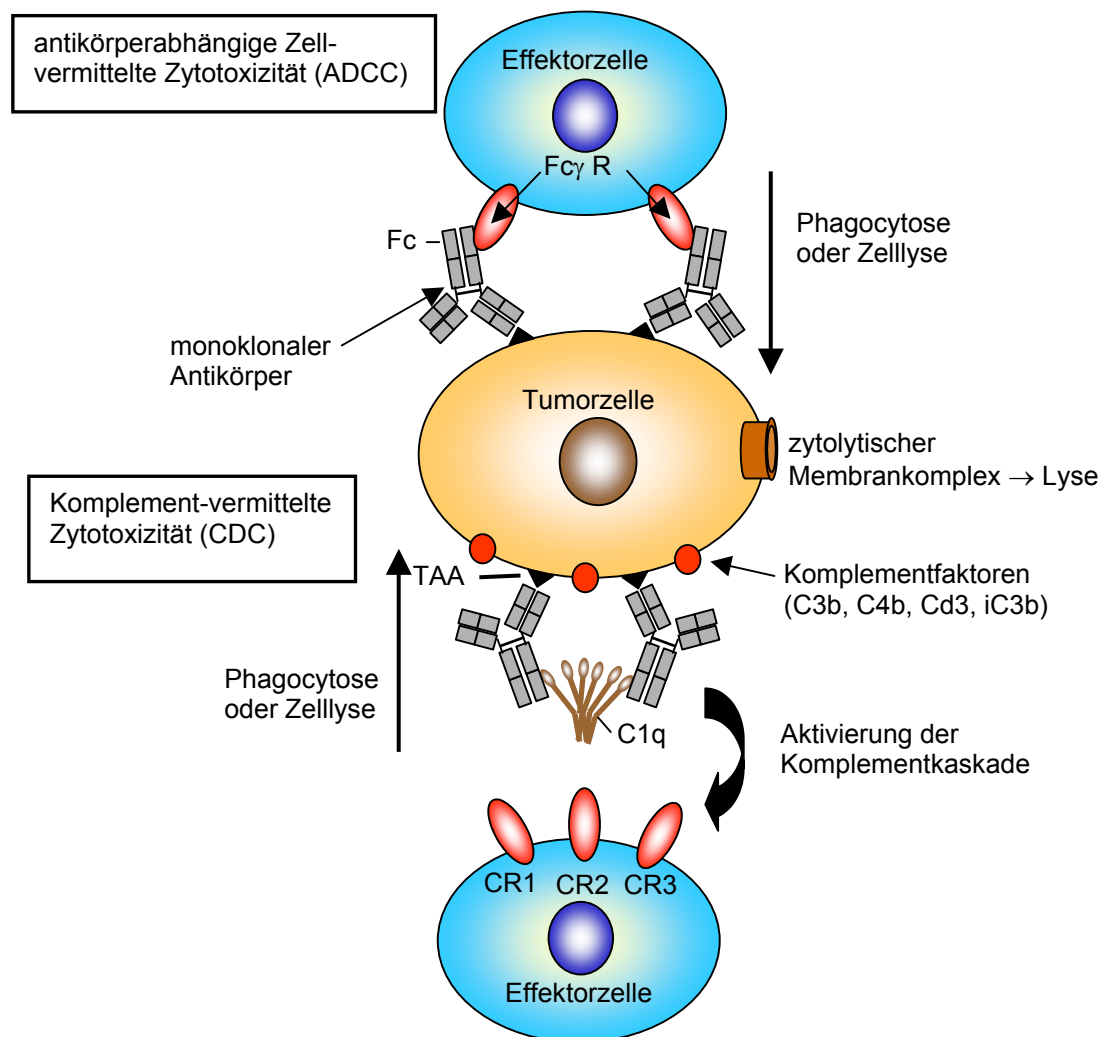


Abb.2 Antikörper-abhängige Effektormechanismen bei Behandlung von Krebserkrankungen.

Abkürzungen: ADCC antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität; CDC Komplement-vermittelte Zytotoxizität; CR Komplementrezeptor; Fc konstantes Fragment; Fc γ R Fc γ -Rezeptor; TAA Tumor assoziiertes Antigen.

Ein weiterer Mechanismus der Antikörper-abhängigen Immunabwehr stellt die Komplement-vermittelte Zytotoxizität (CDC = complement dependent cytotoxicity) dar [42, 43]. Das Komplementsystem besteht aus einer Reihe von Plasmaproteinen, die unter anderem durch die Bindung von Ak an die Tumorzelle aktiviert werden können. Das führt zu einer Kaskade von Reaktionen, die letztendlich zur Bildung eines membranangreifenden Komplexes in der Membran der Zielzelle führt, der diese damit osmotisch destabilisiert. Bereits die Bindung der Komponenten des Komplementsystems an die „Antikörper-markierte“ Tumorzelle wirkt opsonisierend für die Phagozytose. Die Monozyten und Makrophagen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche eine Reihe an Komplement-Rezeptoren, wie z.B. CR1, CR2 und CR3, die die Phagozytose stimulieren können. Die vorgestellten, durch Antikörper induzierbaren Effektormechanismen bilden die Grundlage von Behandlungsstrategien von Krebserkrankungen.

1.1.2.1. Bereits in der Tumorthherapie eingesetzte Antikörper

In den letzten Jahren wurden mehrere monoklonale Antikörper zur Behandlung von verschiedenen Krebserkrankungen entwickelt, die als Medikamente zugelassen sind (Tabelle 1). Seit Ende 1998 wird der humanisierte anti- HER2 (humaner epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor 2) Antikörper Herceptin® bei der Behandlung von metastasierendem Brustkrebs eingesetzt. HER2 ist überexprimiert in 15-30% der Mammarkarziome [44, 45]. Herceptin® ist als erster Antikörper zur Behandlung von soliden Tumoren zugelassen worden. Cobleigh et al. zeigten in der Phase III Studie eine 15%-Ansprechrate des Herceptin®-Antikörpers als „single agent“. Der Antikörper wurde 222 Patientinnen verabreicht, die trotz einer Chemotherapie ein progressives Wachstum des Tumors aufwiesen. Die mittlere Antwortzeit (Zeitraum von der ersten Immunantwort bis zur Progression der Krankheit bzw. bis zum Tod) betrug 9,1 Monate, die mittlere Überlebenszeit lag bei 13 Monaten [46]. Diese Studie demonstrierte die Einsetzbarkeit und Sicherheit von Herceptin® als „single agent“ bei der Behandlung von metastasierendem Brustkarzinom, unterstrich aber auch durch die geringe Ansprechrate die Notwendigkeit für weitere Modifizierungen der Antikörper-basierenden Therapie. In der Tabelle 1 wurden ausgewählte Beispiele an Antikörpern, die bereits in der Tumorthherapie eingesetzt werden, zusammengestellt.

Name des Ak Handelsname	Ziel- antigen	Strategie zur Steigerung der Aktivität des Ak	Zieltumor	Status	Referenz
Bevacizumab (Avastin™)	VEGF	Kombination mit Chemotherapie	metastasieren de NSCLC metastasieren de CRC	Phase III, Phase III	Willett et al. [47]
Alemtuzumab (Campath-1H®)	CD52	keine	B-Zelle CLL	zugelassen in den USA Mai 2001	Ferrajoli et al. [48]
Trastuzumab (Herceptin®)	ERBB2	Kombination mit Chemotherapie	metastasieren des Mammakarzin om (Überexpressi on ERBB2)	zugelassen in den USA September 1998	Leyland- Jones [49]
Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg®)	CD33	konjugiert mit Calicheamicin	AML	zugelassen in den USA Mai 2000	Sievers und Linenberger [50]
Edrecolomab 17-1A (Panorex®)	EpCam	Kombination mit Chemotherapie	Dukes'C CRC	zugelassen in Deutschland Januar 1995	Riethmüller et al. [51]
Rituximab (Rituxan® /MabThera®)	CD20	Kombination mit Chemotherapie	NHL	zugelassen in den USA November 1997	Grillo-Lopez et al. [52]

Tabelle 1. Beispiele für die Verwendung monoklonaler Antikörper in der Tumorthherapie
Abkürzungen: VEGF vascular endothelial growth factor; NSCLC non small cell lung cancer; CRC colorectal cancer; CLL chronisch lymphatische Leukämie; ERBB2 erythroblastic leukaemia viral oncogene homology 2; AML akute myeloblastische Leukämie; EpCam epitheliales Adhäsionsmolekül; NHL non Hodgkin lymphoma.

Es wurden verschiedene Strategien entwickelt, um die Effizienz von eingesetzten Antikörpern zu erhöhen. Ein Beispiel ist die Kombination der Ak mit zytotoxischen Wirkstoffen. Salmon et al. präsentierten in einer randomisierten Phase III Studie einen statistisch signifikanten Nutzen in Patientinnen mit metastasierendem Brustkarzinom nach der Behandlung mit Herceptin® in Kombination mit Chemotherapeutika (Doxorubicin und Cyclophosphamid) im Vergleich zu einer Kontrollgruppe mit Patientinnen ohne adjuvante Antikörperbehandlung (längere mittlere Immunantwortzeit 9,1 versus 6,1 Monate; höhere Ansprechrate 50% gegen 32% und geringere Mortaliätsrate pro Jahr 22% gegen 33%) [53]. Der zusätzliche Einsatz von Herceptin® brachte keine weiteren Nebenwirkungen mit sich im Vergleich zur Chemotherapie (z.B. Kardiotoxizität) [54]. Der Einsatz von monoklonalen Antikörpern bewährte sich bei Patienten im

Stadium mit minimalen Resterkrankungen (MRD, nach der Entfernung des Tumors verbleibende maligne Zellen) und Mikrometastasen. Im Jahre 1994 wurde eine randomisierte klinische Studie durchgeführt, in der 189 Patienten mit Kolorektalkarzinom im Stadium Dukes C, d.h. mit Primärtumor und lokalem Lymphknotenbefall, aber ohne Fernmetastasen, mit dem monoklonalen Antikörper 17-1A behandelt wurden. Vor der Behandlung wurden die Patienten einem operativen Eingriff unterzogen, bei dem der Primärtumor und die lokalen Lymphknoten entfernt wurden [55]. Der 17-1A Antikörper erkennt ein 30-40 kDa-Glykoprotein auf der Oberfläche einer Reihe von epithelialen Tumoren u.a. auf Pankreas-, Magen- und Kolon/Rektum-Karzinomen [56]. Der 17-1A Antikörper (Handelsname Panorex[®], seit 1995 in Deutschland als Therapienantikörper zugelassen) wurde 99 von 189 Patienten intravenös appliziert. Die restlichen Patienten stellten eine Kontrollgruppe ohne adjuvante Antikörpertherapie dar. Nach einer siebenjährigen Therapie konnte eine signifikante Abnahme der Gesamtmortalität um 32% und eine Reduktion der Rückfallrate auf 23% beobachtet werden. Während die Zahl der Fernmetastasen deutlich reduziert war, blieb die Zahl der lokalen Rezidive unverändert. Durch die bessere Zugänglichkeit der nicht soliden Tumoren für die Antikörper kommt es zur verbesserten Antikörper-Tumorlokalisierung und somit zur erhöhten Effizienz bei der Behandlung von malignen Erkrankungen.

Insgesamt sind jedoch die klinischen Ergebnisse der Antikörpertherapien bei fortgeschrittenen Krebserkrankungen bisher unbefriedigend. Zwei der Hauptgründe sind die Größe der Antikörpermoleküle, die das Eindringen in das Gewebe und somit die Lokalisierung im Tumor einschränkt, und eine unerwünschte Aufnahme der Antikörper von den retikulären Endothelzellen über den Fc-Rezeptor [57]. Eine Verbesserungsmöglichkeit besteht hier in der Anwendung von kleineren antigenbindenden Antikörperfragmenten z.B. Fab-Fragmenten. Aufgrund ihrer verringerten Größe sind sie in der Lage, in das Tumorgewebe effizienter einzudringen, jedoch werden sie sehr schnell aus der Blutbahn eliminiert. Eine weitere Hürde bei der Behandlung solider Tumoren ist die Entwicklung von humanen Anti-Maus-Antikörpern (HAMA) bei den therapierten Patienten. Dadurch wird die mittlere Halbwertszeit der erneut applizierten murinen Antikörper verkürzt, und die zytotoxische Aktivität stark reduziert [58, 59]. Durch Humanisierung der Antikörper d.h. Austausch von konstanten Domänen der schweren und leichten Kette und zusätzlich von framework Regionen der murinen gegen die von humanen Antikörpern [60], wird die Immunogenität deutlich ver-

ringert. Es kommt nur noch zu abgeschwächten Immunreaktion gegen die in der Therapie eingesetzten Antikörper.

Des weiteren wird die Effizienz einer Antikörper-abhängigen Therapie durch eingeschränkte Zugänglichkeit des Tumors für Antikörper limitiert. Im Vergleich zum umgebenden Gewebe herrscht im Tumor ein deutlich erhöhter Interstitialdruck, wodurch ein Druckgradient von zentral nach peripher entsteht. Antikörper, die sich in tumorangrenzendem Gewebe befinden, gelangen nicht ins Tumorrinnere [61, 62]. Das bedeutet, dass für die Wirksamkeit solcher Therapieansätze auch die Größe der behandelnden Tumoren und somit ein möglichst früher Therapiebeginn eine wesentliche Rolle spielen können.

1.1.3. Immuntherapie mit genetisch modifizierten zytotoxischen T-Zellen

Die oben vorgestellten Studien demonstrieren, dass das Immunsystem generell imstande ist, eine anti-Tumor Antwort zu entwickeln, obwohl die Reaktionen oft unzureichend ausfallen. Das Ziel der Immuntherapie ist es daher, die natürlichen Eigenschaften des Immunsystems wie Spezifität und Sensitivität so auszunutzen und zu verstärken, dass das Patienten-eigene Immunsystem die Krankheit eliminieren kann. Die Wirksamkeit und Einsetzbarkeit der oben genannten anti-Tumor Immuntherapien wird von vielen limitierenden Faktoren stark eingeschränkt. Bei der T-Zell-basierenden Therapie erwiesen sich die Tumor-„escape“ Mechanismen, wie Herunterregulation von MHC Klasse I und von kostimulatorischen Signalmolekülen, als sehr stark begrenzend. Eine weitere Hürde stellte die Problematik der Generierung ausreichender Mengen an reaktiven T-Zellen dar. Die Antikörper-basierende Immuntherapie wird wiederum durch die eingeschränkte Zugänglichkeit zu den soliden Tumoren und häufig unzureichende Effizienz der Antikörper-abhängigen Effektormechanismen *in vivo* stark limitiert. Die Immuntherapie mit genetisch modifizierten T-Zellen vereint gleichzeitig die Vorteile der beiden oben genannten Therapien und schließt die limitierenden Faktoren aus. Im Gegensatz zu Antikörpern sind die zytotoxischen T-Zellen in der Lage, in solide Tumoren einzudringen und diese zu zerstören. Auf der anderen Seite bieten die Antikörper eine spezifische, HLA-unabhängige Antigenerkennung. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde eine neue Form der Gentherapie entwickelt, zur Modifizierung der CTL mit chimären T-Zell-Rezeptoren

(chTCR), bei denen die Antigen-bindende Domäne von einem Antikörper, und die Signal-vermittelnde Domäne von dem T-Zell-Rezeptor stammen.

1.1.3.1. Molekulare Struktur von chimären Rezeptoren

Die spezifische T-Zell-Antwort gegen Zielzellen wird über den T Zell-Rezeptor Komplex vermittelt. Jeder T-Zell-Rezeptor besteht aus zwei glykosylierten Polypeptidketten, einer α - (40-50 kDa) und einer β - (40-45 kDa) Kette, die miteinander durch eine Disulfidbrücke verbunden sind (Abb.3). Jede Kette besteht im extrazytoplasmatischen Anteil aus zwei Ig-ähnlichen Domänen, einer variablen und einer konstanten Domäne. Die intrazytoplasmatische Sequenz ist sehr kurz, sie besteht aus fünf bis zwölf Aminosäuren und beinhaltet keine Signal-vermittelnden Elemente. Die α - und β - Ketten sind als Heterodimere für die MHC-Peptid-Erkennung verantwortlich. Die Ähnlichkeit der variablen und konstanten Domänen des TCR zu denen eines Antikörpers wurde durch die vergleichende Analyse der Organisation der Gene bestätigt [63]. Die variable Domäne umfaßt V-, D- und J-artige Elemente in der β -Kette und V- und J-artige Elemente in der α -Kette, was der genetischen Organisation der schweren und leichten Immunglobulinketten entspricht. Zusätzlich konnten innerhalb der variablen Domäne ebenfalls hypervariable Sequenzen identifiziert werden, die als „complementarity determining regions“ (CDR) bezeichnet werden und für die spezifische Antigenbindung zuständig sind.

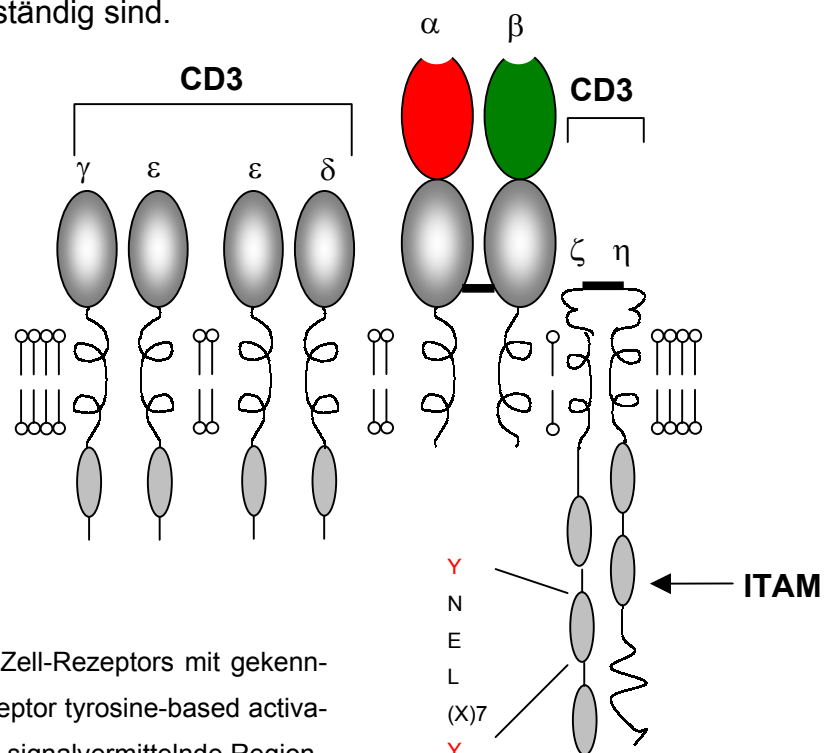


Abb.3

Struktureller Aufbau eines T-Zell-Rezeptors mit gekennzeichneter ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation's motifs)-Sequenz als die signalvermittelnde Region.

Das $\alpha:\beta$ Heterodimer kann nur in Assoziation mit dem CD3 Komplex stabil auf der Zelloberfläche exprimiert werden [64]. In den Transmembrandomänen der α - und β -Kette kommen positiv geladene Aminosäuren vor (Lysin und Arginin in der α -Kette und Lysin in der β -Kette). Solche geladenen Reste in Transmembrandomänen sind ungewöhnlich und führen normalerweise zur Destabilisierung. In diesem Fall spielen sie eine entscheidende Rolle bei der Wechselwirkung mit den negativ geladenen Aminosäuren (Asparaginsäure) in den Transmembrandomänen der Polypeptidketten des CD3 Komplexes. Der CD3 Komplex besteht aus mindestens fünf verschiedenen Ketten: einer glykosylierten γ - Kette von 25-28 kDa, einer glykosylierten δ - Kette von 20 kDa, einer nicht glykosylierten ε - Kette von 20 kDa, sowie einer nicht glykosylierten ζ -Kette von 16 kDa und einer η -Kette von 21 kDa. Die extrazytoplasmatischen Teile der γ -, δ - und ε -Ketten bestehen aus jeweils einer Ig- ähnlichen Domäne, die keine Variabilität aufweist. Die ζ - und η -Ketten besitzen nur kurze extrazelluläre Anteile von nur neun Aminosäuren. Der TCR-CD3-Komplex enthält entweder zwei ζ -Ketten oder ein Heterodimer aus einer ζ -Kette und einer η -Kette. Alle fünf Ketten weisen in ihrem intrazytoplasmatischen Teil mehrere ITAM-Sequenzen (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) auf, die sie nach der Stimulation über den TCR zu einer Assoziation mit Proteintyrosinkinasen zur Übertragung des Signals in das Zellinnere befähigen.

Die Antikörper des IgG-Isotyps sind aus zwei verschiedenen Polypeptidketten zusammengesetzt, einer schweren (50 kDa) H (heavy)-Kette und einer leichten (25 kDa) L (light)-Kette. Jedes IgG-Molekül enthält jeweils zwei schwere und zwei leichte Ketten. Die beiden schweren Ketten sind durch Disulfidbrücken miteinander verbunden und jede schwere Kette ebenfalls durch eine Disulfidbrücke mit einer leichten Kette. Die schweren und leichten Ketten setzen sich aus konstanten und variablen Regionen zusammen. Jede leichte Kette besteht aus einer konstanten (C_L) und einer variablen (V_L) Domäne, während die schweren Ketten von drei konstanten (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}) und einer variablen (V_H) Domänen gebildet werden. Während die C-terminalen Domänen der H-Ketten die Effektorfunktionen des Antikörpers bestimmen (wie Bindung an zelluläre Rezeptoren oder Aktivierung des Komplementsystems) sind die N-terminalen variablen Domänen der leichten und schweren Ketten für die Antigenbindung verantwortlich (Abb.4).

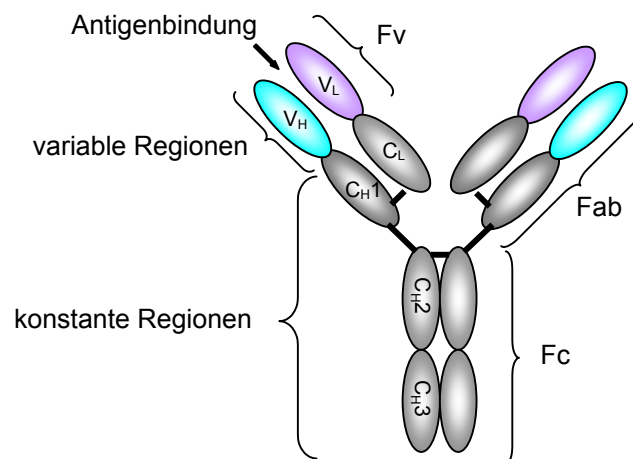


Abb. 4 Struktureller Aufbau eines Antikörpers. Abkürzungen: **C_H** konstante schwere Domäne; **C_L** konstante leichte Domäne; **Fab** Antigen-bindendes Fragment; **Fc** konstantes Fragment; **Fv** variables Fragment; **V_H** variable schwere Domäne; **V_L** variable leichte Domäne.

Die Bindungsspezifität eines Antikörpers wird durch die hypervariablen Regionen (HV1, HV2 und HV3) bestimmt. Der variabelste Teil liegt in der HV3-Region. Die Abschnitte zwischen den hypervariablen Regionen nennt man Gerüstregionen („*framework regions*“). Es gibt vier davon: FR1, FR2, FR3 und FR4. Die Gerüstregionen bilden die β -Faltblätter, die strukturelle Basis der Domäne. Die hypervariablen Regionen kommen durch die Faltung in räumliche Nähe und bilden die für die Bindung des Antigens verantwortliche Oberfläche der variablen H- und L-Ketten. Da die dabei entstehende Oberflächenstruktur zu einem bestimmten Antigen komplementär ist, werden die variablen Regionen auch als komplementaritätsbestimmende Regionen (*complementarity determining regions*, CDR1, CDR2 und CDR3) bezeichnet.

Die auffallend große strukturelle Ähnlichkeit der schweren und leichten Immunglobulinketten und der $\alpha\beta$ T-Zell-Rezeptorketten lieferte die Basis zur Generierung von chimären T-Zell-Rezeptoren. Die dabei entstehende MHC-unabhängige Antigenerkennung bietet eine potenzielle Möglichkeit, um die Tumor-„*escape*“ Mechanismen zu überwinden.

1.1.3.2. Modifizierung von T-Zellen mit chimären Rezeptoren

In den ersten Versuchen zur Generierung von T-Zellen mit chimären Rezeptoren wurden die variablen V-Domänen der α - und β -Ketten des T-Zell-Rezeptors durch die entsprechenden Domänen der leichten und schweren Ketten eines Antikörpers ersetzt [65, 66, 67]. Die chimären TCR-Ketten konnten als funktioneller Rezeptor im Komplex mit dem CD3-Molekül an der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte eine Antigen-abhängige IL2-Produktion und spezifische Zielzellyse beobachtet werden [68]. Diese Studien lieferten Beweise dafür, dass ein Austausch von variablen Domänen des T-Zell-Rezeptors gegen die eines Antikörpers in einem funktionsfähigen chimären Rezeptor resultieren kann, und somit die T-Zellen zu einer nicht MHC-restringierten Antigenerkennung befähigt werden können.

Aufgrund der besonderen Eigenschaften der Zeta-Kette des CD3-Komplexes wurden im Folgenden Rezeptoren generiert, in denen die extrazellulären und Transmembran-Domänen von CD8 (als *hinge* Region) direkt mit den zytoplasmatischen Immunrezeptordomänen der CD3 ζ -Kette fusioniert wurden [69]. Die ζ -Kette des CD3 Komplexes weist intrazellulär drei ITAM Sequenzen auf, die für die Transduktion des intrazellulären Signals und somit für die Induktion von Effektorfunktionen verantwortlich ist. Die chimäre ζ -Kette wurde ohne Assoziation mit dem TCR-Komplex expriert und war in der Lage, eine Signaltransduktionskaskade auszulösen. Basierend auf diesen Ergebnissen und um die Notwendigkeit der Koexpression von zwei chimären Genen (V_H -*hinge* Region mit V_L -*hinge* Region) zu umzugehen, wurde eine neue Generation an chimären Rezeptoren entwickelt. Aufbauend auf einer Studie von Bird et al. wurde [70] ein Konstrukt mit einem scFv („*single chain antibody*“) als antigenbindende Domäne generiert. ScFv bestehen aus Antikörper-abgeleiteter Aminosäuresequenz der variablen leichten und schweren Domänen, die miteinander über einen flexiblen Linker verbunden sind. Mittels der Linkersequenz wird die richtige Orientierung der beiden V_L und V_H Domänen und deren Assoziation ermöglicht. Dadurch soll die ursprüngliche Spezifität und Affinität des parentalen Antikörpers erhalten bleiben. Eshar et al. generierten im Jahre 1993 die ersten scFv-basierenden chimären Rezeptoren. Die antigenbindende Domäne wurde extrazellulär direkt mit einer Signaltransduktionskette fusioniert (ζ -Kette des CD3-Komplexes bzw. γ -Kette des Fc γ RIII). Die chimären Rezeptoren befähigten die modifizierten zytotoxischen T-Zellen zur MHC-unabhängigen, antigenspezifischen Zellyse und IL2-Produktion [71]. Diese Erkenntnisse konnten in einer *in vitro* Studie mit modifizierten HER2/neu spezi-

fischen T-Zellen bestätigt werden [72]. Das immuntherapeutische Potenzial von anti-HER2 T-Zellen wurde von Moritz et al. in einem Mausmodell untersucht. Der adoptive Transfer von modifizierten T-Zellen resultierte in einem verlangsamten Wachstum des Tumors, was auf die Tumorlokalisierung der Effektorzellen und effiziente Zelllyse der Tumorzellen zurückzuführen war [73]. Die erweiterte Anwendbarkeit von T-Zellen, die mit chimären Rezeptoren modifiziert wurden, wurde im Vergleich zu konventionellen T-Zell-basierenden Strategien durch eine weitere *in vivo* Studie bestätigt. Die T-Zellen wurden mit einem chimären Rezeptor gegen das humane FBP (ovariales Adenokarzinom-assoziiertes Antigen) ausgestattet. In einem syngenem Mausmodell wurden murine FBP-positive Sarkomzellen i. v. (intravenös) injiziert. Durch die Behandlung mit den modifizierten T-Zellen wurde eine erhöhte Überlebensrate und signifikante Reduktion der Metastasen in der Lunge erzielt [74].

In den letzten Jahren wurde eine Reihe an chimären Rezeptoren entwickelt, die gegen verschiedene tumorassoziierte Antigene gerichtet sind. Voraussetzung bei der Generierung solcher Konstrukte ist das Vorhandensein von einem identifizierten, tumorsassoziierten Oberflächenantigen und Antikörpern, die gegen dieses Antigen gerichtet sind. Tumorantigene wie z.B. HER2/Neu [75], FBP [76], CEA [77], CD30 [78], VEGF-R2 [79] wurden als Zielantigene für eine adjuvante Immuntherapie mit modifizierten T-Zellen eingesetzt. Die Effektivität der chimären Rezeptoren wurde mittels verschiedener *in vitro* Experimente untersucht, wie IL-2-, IFN γ - und TNF α -Produktion, Proliferation und zytotoxische Lyse von Tumorzellen. Vielversprechende Ergebnisse wurden bei der Behandlung des humanen Dickdarmkarzinoms in *scid*-Mäusen oder des murinen Adenokarzinoms des Dickdarms in syngenem Mäusen mit scFv-anti-CEA- ζ -Rezeptor modifizierten T-Zellen erzielt. Durch den adoptiven T-Zell-Transfer konnte die Metastasenbildung verhindert werden. Zusätzlich wurde das Wachstum der etablierten Tumoren und deren Metastasen deutlich inhibiert [80]. Vor kurzem wurde zum ersten Mal eine *in vivo* Effizienz der genetisch modifizierten humanen primären T-Zellen bei der Behandlung des Burkitt-Lymphoms in *scid*-Mäusen demonstriert [81]. Die mit scFv-anti-CD19 ζ -Rezeptoren (B-Zell-Lymphom-assoziiertes Antigen) ausgestatteten T-Zellen führten zur Eliminierung des Tumors. Die im Rahmen von zahlreichen Studien demonstrierte anti-Tumor-Effizienz von mit chimären Rezeptoren modifizierten T-Zellen spricht für das mögliche, klinische Potenzial solcher Zellen bei der Behandlung von Krebserkrankungen.

Die T-Zell-Kostimulation ist ein wichtiger Aspekt bei der Entwicklung einer adoptiven T-Zell-Immuntherapie. Übereinstimmend mit dem „Zwei-Signal-Modell“ [82, 83] für die T-Zell-Aktivierung wird neben dem Signal über den chimären TCR ein zweites für die effiziente Aktivierung benötigt. Der Einsatz von den ζ - oder γ -Signalketten beim Aufbau von chimären Rezeptoren ist ausreichend für die Induktion der zytotoxischen Aktivität. Das über CD28 vermittelte kostimulatorische Signal führt zusätzlich zu Zell-Proliferation und Zytokinsekretion (IL-2, IFN γ). Darüber hinaus verhindert das kostimulatorische Signal die Aktivierungs-induzierte Anergie der T-Zellen [84, 85, 86]. Eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung der naiven T-Zellen spielt CD28 durch eine Interaktion mit dem CD80 bzw. CD86 Molekül auf den Ag-präsentierenden Zellen (APC). CD28 besteht extrazellulär aus einer Ig-ähnlichen Domäne und wird als Homodimer bzw. als Monomer auf der Zelloberfläche exprimiert (Abb.5). Die kurze intrazelluläre Domäne von CD28 weist Sequenzen auf, die nach Bindung an CD80 bzw. CD86 eine Signalkaskade auslösen, die im Zusammenspiel mit TCR-vermittelten Signale in der Lage ist, die T-Zellen effizient zu aktivieren. Vom Standpunkt einer adoptiven Immuntherapie ist die lang anhaltende anti-Tumor Antwort mit effizienter Tumorzellyse, T-Zellproliferation und Zytokinproduktion entscheidend. Für Tumorzellen ist bekannt, dass sie kostimulatorische Moleküle wie CD80/86

rherunterregulieren. Es ist daher nahe liegend, dass die Generation eines chimären scFv-CD28-Rezeptors für eine Antigen-abhängige Kostimulation für eine effektive Aktivierung der T-Zellen notwendig ist. Die Wirksamkeit eines chimären kostimulatorischen Rezeptors wurde zum ersten Mal von Alvarez-Vallina et al. demonstriert. Im Rahmen dieser Studie wurde die humane Jurkat T-Zelllinie mit zwei chimären Hapten-spezifischen Konstrukten, scFv-CD3 ζ und scFv-CD28, co-transfiziert. Neben einer stabilen Oberflächenexpression der beiden Rezeptoren konnte die Fähigkeit zur Aktivierung beobachtet werden, welche der über den wtTCR und wtCD28 ähnelte. Die zusätzliche Transfektion mit scFv-CD28 wirkte sich synergistisch auf die Aktivierung der T-Zellen über den

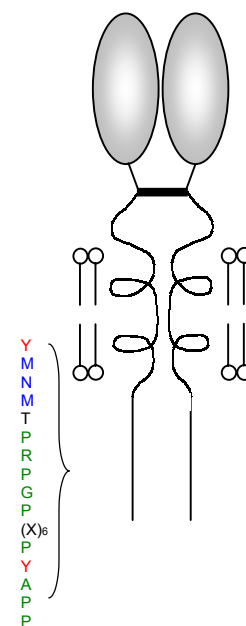


Abb.5 Struktureller Aufbau eines CD28-Moleküls mit gekennzeichneten Signal-vermittelnden Sequenzen.

chimären TCR aus (Sekretion von IL2, Proliferation) [87]. Bereits zwei Jahre später (1998) wurden chimäre Rezeptoren generiert, die das primäre und sekundäre Signal von einem Genprodukt ausgehend liefern können [88]. Der beschriebene Rezeptor bestand extrazellulär aus dem anti-CD33 scFv (akute myeloide Leukämie-assoziiertes Antigen) und einer Hinge-Region (abgeleitet von IgG1 oder von CD28). Im intrazellulären Teil wurde die Signalsequenz des CD28 Moleküls mit der Signalsequenz der CD3 ζ -Kette fusioniert. Die IL-2-Produktion wurde durch die Insertion der Signalregion von CD28 in den chimären Rezeptor im Vergleich zur scFv-CD3 ζ -Kette Transfektanden signifikant erhöht. Einen direkten Vergleich hinsichtlich der Aktivierungseffizienz zwischen einem anti-ERBB2-CD3 ζ - und anti-ERBB2-CD28-CD3 ζ -Rezeptor lieferte eine Studie von Haynes et al. am Mausmodell [89]. Die primären zytotoxischen anti-ERBB2-CD28-CD3 ζ T-Zellen produzierten höhere Konzentrationen an IFN γ und IL-2, was wiederum zu einer verstärkten T-Zellproliferation führte. Darüber hinaus erwiesen sich diese Zellen als wirkungsvoller in der Wachstumsinhibition des etablierten Tumors und der Metastasen. Diese Daten demonstrieren die Vorteile der CD80/86- unabhängigen Kostimulation der T-Zellen für eine wirksame anti-Tumor-Immuntherapie.

Wie bereits erwähnt bestehen die Hauptprobleme einer effizienten Tumorthherapie durch den Transfer Tumor-spezifischer zytotoxischer T-Zellen in 1) der geringen Anzahl der isolierten spezifisch aktivierten autologen T-Zellen, 2) dem raschen Verlust der Aktivität und 3) der kurz anhaltenden Persistenz der transferierten T-Zellen im Organismus. Um diese Einschränkungen zu überwinden erscheint der Versuch sinnvoll polyklonale T-Lymphozyten von Tumorpatienten mit chimären Rezeptoren zu armieren. Von einer gleichzeitigen Expression der chimären T-Zell- und CD-28-Rezeptoren mit einer Antikörper-definierten Tumorspezifität wird erwartet, dass die T-Lymphozyten durch den Antigen-Kontakt zur Zytotoxizität aktiviert werden und im Empfängerorganismus über längere Zeit proliferieren und nicht in die Antigen-induzierte Apoptose geführt werden.

1.2. Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom ist die am häufigsten diagnostizierte maligne Erkrankung des Mannes und dritt häufigste Todesursache nach Lungen- und Darmkrebs in Deutschland. Jährlich werden derzeit etwa 40.000 Prostatakarzinome diagnostiziert und etwa 10% der Betroffenen sterben an dieser Krankheit [90].

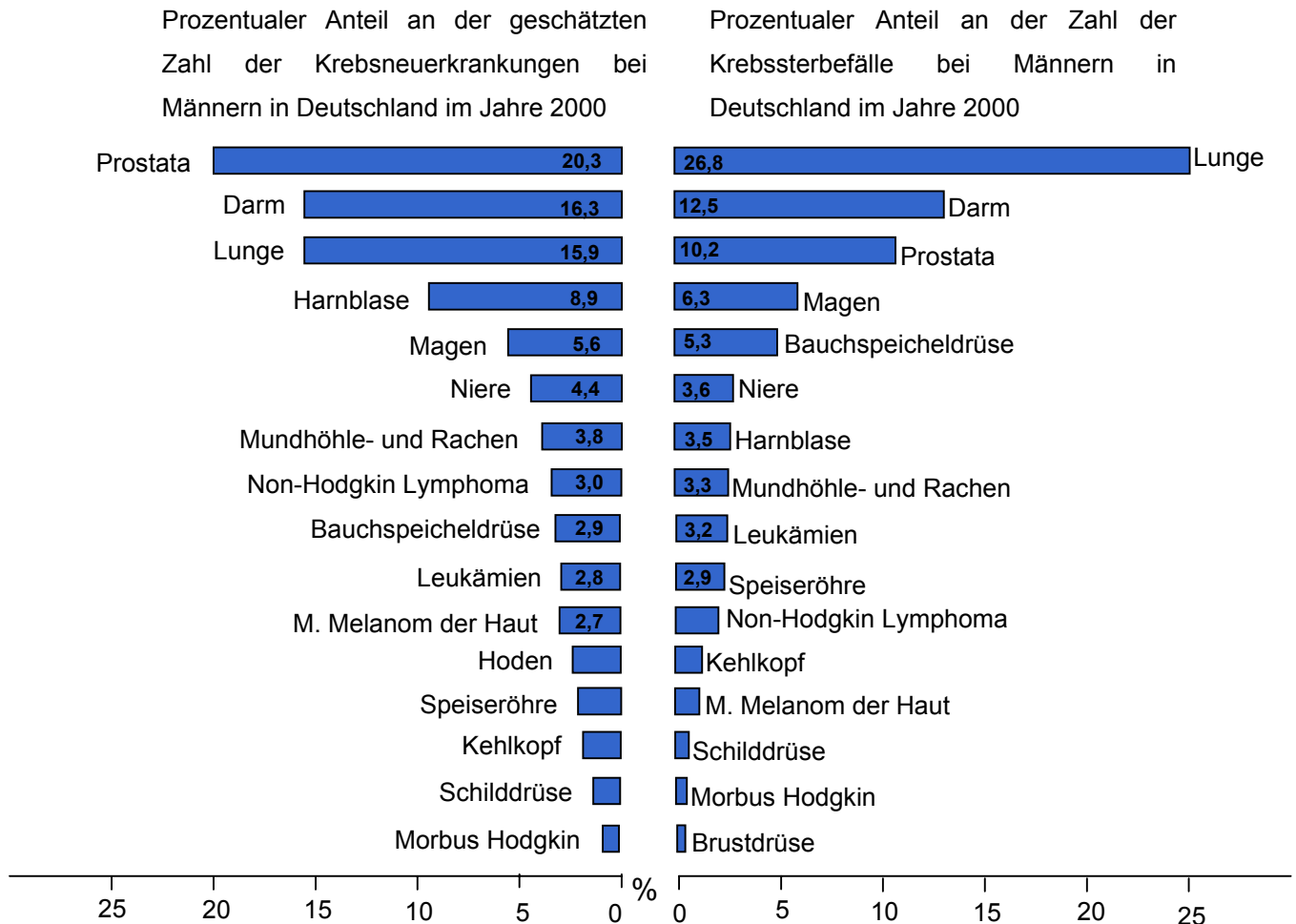


Abb. 6 Prozentualer Anteil an der Krebserkrankungen bzw. Krebssterbefälle bei Männern in Deutschland im Jahre 2002 (Robert Koch Institut Berlin).

Im Fall der primären, lokal eingeschränkten Erkrankungen bieten die klinischen Therapien wie radikale Prostatektomie, Strahlentherapie und seit neuestem Kryotherapie gute Aussichten auf Heilung. Nach Witjes et al. muss bei 25% der radikal operierten Patienten mit Resttumorgewebe oder mit Mikrometastasen in den pelvinen Lymphknoten gerechnet werden [91]. Die Tatsache, dass Tumorzellen zurückblei-

ben, ist prinzipiell mit einer ungünstigen Prognose und mit höherer Wahrscheinlichkeit für sowohl lokale wie auch systematische Rezidive verbunden. Bei Patienten mit Metastasen sind die Therapiemöglichkeiten stark beschränkt. Die am häufigsten Angewandten sind Androgenablation (Hormontherapie) und Chemotherapie, die nur zur Linderung und zusätzlich zu schweren Nebenwirkungen führen. Deswegen ist es äußerst wichtig, eine neue effektive Methode zur Behandlung des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms zu entwickeln.

Die wichtigste Voraussetzung dabei ist die Bestimmung der Zielstruktur als Angriffsstelle der anti-Tumorthherapie. Zwei wesentliche Voraussetzungen müssen bei der Festlegung des Zielantigens unbedingt erfüllt werden: erstens die möglichst Geweberestringierte Expression auf Prostata, und zweitens, eine hohe Expression auf der Zelloberfläche der meisten Prostatatumoren. In den letzten Jahren wurden mehrere Prostatakarzinom-assoziierte Antigene identifiziert. Dazu gehören das prostataspezifische Antigen (PSA) [92], die prostataspezifische saure Phosphatase (PAP) [93] und PrLZ („prostate leucine zipper“) [94], welches wahrscheinlich einen Transkriptionsfaktor darstellt. Es handelt sich dabei um lösliche Proteine, die für die meisten Immuntherapien, wie zum Beispiel „*in vivo targeting*“ durch monoklonale Antikörper oder chimäre Rezeptoren nicht geeignet sind.

1.2.1. Das prostataspezifische Stammzellantigen (PSCA) als Ziel einer adjuvanten Immuntherapie

Das prostataspezifische Stammzellantigen (PSCA) wurde als Membran-ständiges Tumor-assoziiertes Antigen im Jahr 1998 bei der Suche nach Genen, die während der Tumorgenese in dem LAPC-4 Prostata Xenograftmodell hochreguliert wurden, identifiziert [95]. Es gehört zur Thy-1/Ly-6 Familie von GPI-(glycosylphosphatidylinositol) verankerten Zelloberflächenproteinen. Die physiologische Funktion von PSCA ist bis jetzt nicht bekannt. Aufgrund der Zugehörigkeit zur Thy-1/Ly-6 Familie vermutet man, dass PSCA eine Rolle bei der Tumorentstehung spielen könnte. Es besteht aus 123 Aminosäuren und besitzt eine N-terminale Signalsequenz sowie multiple N-Glykosylierungsstellen. PSCA ist in gesundem Prostatagewebe exprimiert, sowie in Urogenitaltrakt-, Nieren- und Plazentagewebe und kann in mehr als 80% der primären Prostatakarzinome mittels einer mRNA *in situ* Hybridisierung detektiert werden. Die PSCA-Expression erhöht sich stark mit anstei-

gendem Gleason-Score (48% bei Gleason 8-10 vs. 22% bei Gleason 5-6) und Tumorstadium (48% bei fortgeschrittenem, metastasiertem Stadium vs. 28% bei organbegrenztem Stadium) [96]. Eine außergewöhnliche Eigenschaft des Prostatakarzinoms ist dessen bevorzugte Knochen-Metastasenbildung bereits in frühem Erkrankungsstadium. Lam et al. untersuchten die Knochen-, Lymphknoten- und Leber-Metastasen von Prostatakarzinom-Patienten (n=10) hinsichtlich der PSCA-Expression mittels Immunhistochemie [97]. In 87,2% der Knochenmetastasen konnte PSCA auf der Zelloberfläche detektiert werden, während in Lymphknoten- und Lebermetastasen jeweils 66,7% als PSCA-positiv befunden wurden. Die mittlere PSCA-Färbungsintensität war in Knochen-Metastasen signifikant höher im Vergleich zu der von Lymphknoten ($2,0 \pm 0,02$ vs. $0,83 \pm 0,31$, $P = 0,014$). Obwohl das Prostatakarzinom ein Androgen-abhängiger Tumor ist, kommt es während der Hormonablations-Behandlung oder der Tumorprogression zur Entstehung von hormonrefraktären Tumorzellen, die sich somit der Therapie entziehen und eine schlechte Prognose für den Patienten bedeuten. Eine Expressionsanalyse demonstrierte eine starke PSCA-Überexpression in den Androgen-unabhängigen Tumoren im Vergleich zu den Androgen-abhängigen (83% vs. 33%). Aufgrund der starken Korrelation des Expressionsniveaus mit Tumorstadium und Progression zur androgenen Unabhängigkeit wird PSCA als neues immunotherapeutisches Zielantigen in fortgeschrittenen Prostatakarzinomen angesehen.

In kürzlich durchgeführten Studien wurde die Tauglichkeit von PSCA als potenzielles therapeutisches Ziel einer T-Zell- und Ak- basierenden Tumorthherapie untersucht.

Dannull et al. präsentierten eine Generierung einer PSCA-spezifischen T-Zell-Antwort [98]. Durch die *in vitro* Stimulation der T-Zellen von Prostatakarzinompatienten mit den autologen Tumorzellen konnten zytotoxische T-Zellen generiert werden, die in der Lage waren, spezifisch PSCA-positive Zellen zu lysieren. Im Rahmen einer Untersuchung von Kiessling et al. wurden PSCA-abgeleitete immunogene HLA-A*0201-restringierte Peptide identifiziert. Es ist gelungen CD8⁺ T-Zellen gegen zwei von acht vorhergesagten Peptiden im Blut von Prostatakarzinompatienten zu detektieren. Die korrekte Präsentation der Peptide als Komplex mit HLA-A*0201 führte zur Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen und zur spezifischen Zelllyse von PSCA-positiven Tumorzellen [99].

Safran et al. demonstrierten eine Inhibition des Tumorwachstums und Metastasenbildung in einem Xenograft-Mausmodell mit humanem Prostatakarzinom, nach der

Behandlung mit PSCA-spezifischen Antikörpern [100]. Die anti-PSCA Antikörper inhibierten die Tumorentstehung in Androgen-abhängigen und -unabhängigen Xenografts, verzögerten signifikant das Wachstum der bereits vorhandenen Tumoren, wodurch die Überlebensrate deutlich erhöht wurde (89 Tage vs. 40 Tage in mit PBS behandelten Mäusen). Darüber hinaus konnten die anti-PSCA Antikörper die Metastasierung des Tumors auch in Mäusen mit großen Tumorherden inhibieren. Diese Studien veranschaulichen das Potenzial von PSCA für eine Behandlung von fortgeschrittenem und metastasierendem Prostatakarzinom.

1.3. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den vielversprechenden Ansatz einer Armierung zytotoxischer T-Zellen mit chimären Tumorantigen-spezifischen Rezeptoren in einem Modell zu evaluieren, das eine direkte Übertragung in die Therapie unterschiedlicher Tumoren erlaubt. Als Antigen wurde das auf Prostatakarzinomzellen exprimierte PSCA gewählt, das wegen einer stark erhöhten Expression bei fortgeschrittenem, hormonrefraktärem Tumorstadium besonders attraktiv erscheint.

Für eine effiziente Aktivierung der naiven T-Zellen sollten entsprechend dem „Zwei-Signal-Modell“ sowohl eine auf dem T-Zell-Rezeptor basierende als auch eine auf dem CD28-Molekül basierende chimäre Kette als zusätzliches, kostimulatorisches Signal konstruiert werden. Hierfür sollte in erster Linie ein monoklonaler PSCA-spezifischer Antikörper generiert werden. Da für die Konstruktion eines chimären Rezeptors nur ein Antikörper, der das Antigen in der nativen, membranständigen Form erkennt, geeignet ist, sollen für die Immunisierung PSCA-exprimierende Zellen eingesetzt werden. Für die native Screening-Analyse der Hybridomaüberstände sollen Zellen mit starker PSCA-Oberflächenexpression verwendet werden. Der isolierte, PSCA-spezifische Hybridomklon sollte anschließend als Quelle zur Gewinnung der für die variablen Domänen des Antikörpers kodierenden DNA eingesetzt werden. Die unter Verwendung von hoch degenerierten Primern amplifizierten V_H- und V_L-PCR-Produkte sollten als Einzelkettenantikörper zusammengefügt werden. Um die ursprüngliche Bindungsspezifität zu erhalten und die Flexibilität des chimären Proteins zu gewährleisten, muss zwischen die beiden variablen Domänen ein Glycin-Serin-Linker inseriert werden. Das zuerst als lösliches PSCA-bindendes Fragment generierte Konstrukt sollte anschließend hinsichtlich seiner Bindungseigenschaften unter Verwendung von PSCA-exprimierenden Zellen untersucht werden.

Der funktionelle PSCA-spezifische Einzelkettenantikörper sollte als nächstes als die Antigen-bindende Domäne für die Generierung von membranständigen, chimären Rezeptoren eingesetzt werden. Als erstes sollte ein Konstrukt bestehend aus Einzelkettenantikörper und Beta-Kette des T-Zell-Rezeptors für Membranverankerung und als Bestandteil des TCR/CD3-Komplexes hergestellt werden. Da die Funktionsfähigkeit dieses neuen Konstrukts nicht vorausgesagt werden konnte, war als alternative Strategie die Herstellung eines chimären Rezeptors auf der Basis der Zeta (ζ) –Kette des T-Zell-Rezeptors vorgesehen.

Um eine effiziente Aktivierung der naiven T-Zellen zu gewährleisten und somit die mögliche Anergie unvollständig aktivierter Zellen zu vermeiden, sollte ein kostimulatorischer Rezeptor mit dem Einzelkettenantikörper als Antigen-bindende Domäne und dem CD28-Molekül als Signaltransduktion-vermittelnde Kette generiert werden. Um die T-Zellen mit den chimären Rezeptoren modifizieren zu können, sollten die Konstrukte als Genkassetten in einen auf „*Moloney murine leukaemia virus*“ basierenden retroviralen Vektor inkloniert werden.

Zum Nachweis der Expression und Bindungsspezifität der chimären Rezeptoren war geplant, lösliches PSCA in einem eukaryotischen System zu exprimieren um seine natürliche Konformation zu gewährleisten.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Die Chemikalien wurden im Allgemeinen von Sigma (Taufkirchen), Merck AG (Darmstadt), Gerbu (Gaiberg) oder Roth (Karlsruhe) bezogen. Bei Verwendung anderer Hersteller wurde dies angegeben.

2.1.2. Lösungen und Puffer

Anodenpuffer 1	300 mM Tris-Base 20 % Methanol (v/v)
Anodenpuffer 2	25 mM Tris-Base 20 % Methanol (v/v)
Coomassie-Entfärbelösung	10 % Eisessig (v/v) 10 % 2-Propanol (v/v)
Coomassie-Färbelösung	10 % Eisessig (v/v) 40 % Methanol (v/v) 0,1 % Coomassie Brilliant Blue G250 (Fluka, Steinheim)
Gelfixierungslösung	10 % Eisessig (v/v) 50 % Methanol (v/v)
6 x Gelladepuffer	30 % Glyzerin (v/v) 0,25 % Bromphenolblau (w/v) 0,25 % Xylenxanol FF (w/v) (Fluka)
Geltrocknungslösung	7 % Eisessig (v/v) 1 % Glyzerin (v/v) 7 % Methanol (v/v)
Kathodenpuffer	25 mM Tris-Base 40 mM 6-Aminocapronsäure (Fluka) 20 % Methanol (v/v)
Lysepuffer für Säugerzellen	50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 300 mM NaCl 2 mM EDTA 1 % NP-40 Protease inhibitor Tablette (1 Tablette/ 10 ml Puffer; Roche)

Lysozymlösung	10 mg/ml Hühnereiweißlysozym in 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
Metallchelate-Chromatographie-Elutionspuffer	50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, pH 8,0 300 mM NaCl 50 - 250 mM Imidazol
Metallchelate-Chromatographie-Probenpuffer (10x)	500 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, pH 8,0 1,5 M NaCl 50 mM Imidazol
Metallchelate-Chromatographie-Waschpuffer	50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, pH 8,0 300 mM NaCl 5 mM Imidazol
PBS	9,55 g/l PBS Trockensubstanz (Biochrom, Berlin)
PFA	4%, 4g/100ml PBS
Saponin	0,1% in PBS, 1% FKS
5 x SDS-Probenpuffer	50 % Glycerin (v/v) 15 % SDS (w/v) 15 % 2-Mercaptoethanol (v/v) 0,15 % Bromphenolblau (w/v)
STET-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA 0,1 M NaCl 5 % Triton X-100 (v/v)
TBE-Puffer	89 mM Tris-HCl, pH 8,0 89 mM Borsäure 2 mM EDTA
TBS	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl
TBSTT	TBS 0,05 % Tween-20 (v/v) (Serva) 0,2 % Triton X-100 (v/v)
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 mM EDTA
Waschpuffer (ELISA)	PBS 0,1 % Tween 20 (v/v)

2.1.3. Kulturmedien

LB-Medium	1 % Trypton (w/v) (Becton Dickinson) 0,5 % Hefeextrakt (w/v) (Becton Dickinson) 1 % NaCl (w/v) pH 7,0
LB-Agar	LB-Medium 15 g/l Agarose (Becton Dickinson)
D-MEM	D-MEM high glucose (4500 mg/ml) (Invitrogen) 10 % FKS (v/v) 100 µg/ ml Penicillin/Streptomycin
RPMI	RPMI 1640 2 mM L-Glutamin 1 mM Natriumpyruvat 1 x nicht essenzielle Aminosäuren 10 % FKS (v/v) 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin (alle Substanzen von Biochrom)

2.1.4. Zelllinien

Die Zelllinien HEK293, HEK293 T, Jurkat, J.RT3-T3.5, P815 und HT1376 wurden von der Sammlung für Zelllinien und Hybridome „American Type Culture Collection“ (ATCC; Manassas, VA, USA) oder der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) bezogen.

Die verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Name	Zellkatalog	Morphologie	Ursprung
HEK293	ATCC CRL-1573	adhärent, epithelial	humanes, embryonales Nierengewebe
Jurkat	DSMZ ACC 282	Suspension	humane akute T-Lymphoblastoide Leukämie
J.RT3-T3.5	ATCC TIB-153	Suspension	humane akute T-Lymphoblastoide Leukämie, von Jurkat Zelllinie abgeleitete Mutante
P815	ATCC TIB-64	Suspension	murine Mastozytomzellen
HT 1376	DSMZ ACC 397	adhärent, epithelial	humaner Transitionalzellkarzinom der Harnblase

Tabelle 2: Ursprung und Merkmale der Zelllinien

Enzyme, Antikörper und Kitsysteme

Enzyme	Bezugsquelle
Alkalische Phosphatase	Promega
DNase1, RNase-frei	MBI Fermentas
DNA-Polymerase I Large (Klenow) Fragment	Promega
Easy-A High Fidelity PCR Cloning Enzyme	Stratagene
T4 Ligase	Promega
Trypsin/EDTA	Sigma
Restriktionsendonukleasen	
<i>Apal</i> , <i>Bam</i> HI, <i>Cl</i> al, <i>Eco</i> RI, <i>Eco</i> RV, <i>Hind</i> III, <i>Hpa</i> I, <i>Kpn</i> I, <i>Xho</i> I	Amersham Biosciences
<i>Kpn</i> 2I	MBI Fermentas
RNase A	Roche

Kitsysteme	Bezugsquelle
Advantage-HF2 PCR Kit	Clontech
CalPhos Mammalian Transfection Kit	Clontech
Eukaryotic TA Expression Kit (pCR3.1-Uni)	Invitrogen
Fast Link DNA Ligation Kit	Epicentre
Invisorb Plasmid Maxi Kit	Invitex
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Mouse monoclonal Antibody Isotyping Reagents	Sigma
ReproGel Long Read	Amersham Biosciences
Super Script First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen
QIAquick Gel Extraktion Kit	Qiagen
TA Cloning Kit (pCR2.1)	Invitrogen
Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit	Amersham Biosciences
Tri Pure Isolation Reagent	Boehringer Mannheim

Antikörper	Bezugsquelle
Maus-anti-Human TCR β C	Endogen

Maus-anti-Human TCR α C	Endogen
Maus-anti- <i>c-myc</i>	Invitrogen
Kaninchen-anti-Maus Ig-HRP	DAKO
Ziege F(ab) ₂ -anti-Maus Ig-PE	DAKO
Ziege F(ab) ₂ -anti-Maus Ig-FITC	DAKO
Ziege-anti-Maus F(ab) ₂ -Cy3	Dianova
Maus-anti-Human CD28	Pharmingen
Maus-anti-Human CD3 ζ Kette	Pharmingen
Maus-anti-Human Phospho-CD3 ζ Kette	Santa Cruz
Kaninchen-anti-Phospho-Akt	Cell Signalling
Kaninchen-anti-Maus Ig	DAKO
Maus-anti-Kaninchen Ig-HRP	Chemicon
Maus-anti-Human CD28-FITC	Pharmingen
Maus-anti-Human CD3-PE	Pharmingen

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Isolierung der Gesamt-RNA

Für die RNA-Extraktion wurden ungefähr 5×10^6 Zellen in 1 ml TriPure[®] Isolation Reagent (ehemals Boehringer, Mannheim) aufgenommen und nach den Angaben des Herstellers behandelt. Die isolierte RNA wurde in Diethylpyrocarbonate (DEPC) –behandeltem RNase-freiem H₂O aufgenommen und die Reinheit der RNA wurde durch die spektrophotometrische Bestimmung des Verhältnisses von OD_{260 nm}/ OD_{280 nm} untersucht. Mögliche genomische DNA-Kontaminationen wurden mittels DNase I (MBI Fermentas) nach Originalprotokoll des Herstellers entfernt. Die RNA wurde entweder direkt für die Umschreibung eingesetzt oder langfristig bei – 80°C gelagert.

2.2.2. Reverse Transkription von mRNA

Die Umschreibung der mRNA in cDNA erfolgt mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase. 5 µg der Gesamt-RNA wurde zur cDNA-Synthese unter Verwendung des Oligo(dT)₁₈-Primers mit Hilfe des Super Script First Strand Synthesis System for RT-PCR Kits (Invitrogen) eingesetzt. Den Anweisungen des Herstellers wurde strikt gefolgt. Die cDNA wurde in DEPC-H₂O verdünnt und in Aliquots bei -80°C gelagert.

2.2.3. Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction-PCR) erlaubt die selektive Amplifikation von bestimmten DNA-Regionen unter Verwendung von zwei Oligonukleotiden, die am 5'- bzw. 3'-Ende des gewünschten DNA-Stücks binden. Für die Reaktion wurden die Advantage-2 High Fidelity (HF) Polymerase (BD Clontech) bzw. die Easy-A High Fidelity PCR Cloning Enzyme (Stratagene) benutzt. Die PCR wurde in 25 µl Ansätzen mit je 25 pmol Oligonukleotidprimern, 1 mM dNTP (Amersham), 1x Reaktionspuffer und Taq Polymerase in 200 µl Reaktionsgefäßen (Eppendorf) in dem PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research) durchgeführt. Die verwendeten Primer sind in der Tabelle 3 aufgelistet.

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	PCR-Laufbedingungen
BetaC2 for BetaC2 rev	GTCGACATCGATGACCTGAAAAACGTGTTCCCACCC TCCGGAGTTAACGTAGGAGATGAGAAGCAGAGTGAG	35 Zyklen: 94°C→45sek, 70°C→45sek, 72°C→2min
CD28_FL for CD28_FL rev	GGATCCATCGATGGAAACAAGATTTTGGTGAAGCA GTCG TCCGGAGTTAACGCGTCCGTGTCAGGAGCGATAG GC	35 Zyklen: 94°C→45sek, 70°C→45sek, 72°C→2min
sPSCA for sPSCA rev	TTTAAGCTTCTGCTGZGCTACTCCTGC AAAGGTACCCCCGCTGGCGTTGCACAAG	35 Zyklen: 94°C→45sek, 68°C→45sek, 72°C→1min
T7 for BetaC woSTOP rev	TAATACGACTCACTATAGGG GATATCAGACAGGACCCCTTGCTG	35 Zyklen: 94°C→45sek, 56°C→1min, 72°C→1min 45sek
CD3zeta-TM/IC for CD3zeta rev	GATATCGATCCCAAACCTCTGCTACC GATATCTTAGCGAGGGGGCAGGG	35 Zyklen: 94°C→45sek, 56°C→1min, 72°C→ 30sek
IgG1-V _H for1 IgG1-V _H for2 IgG1-V _H rev	GGATCCSARGTNMAGCTGSAGSAGTC GGATCCSARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG GAATTCGTCGACCCTCCGCCACCAGACCCTCCGC CACCAGACCCTCCGCCACCATAGACAGATGGGGG TGTCGTTTTGGC	40 Zyklen: 94°C→1min, 50°C→1min, 72°C→ 1min
IgG1-V _L for IgG1-V _L rev	GAATTCTGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA GGGCCCGGATACAGTTGGTGCAGCATC	40 Zyklen: 94°C→1min, 50°C→1min, 72°C→ 1min
T7 for AMI f.BetaC2 rev	siehe oben ATCGATATGTCGACGGCGCTATTGAG	35 Zyklen: 94°C→45sek, 60°C→1min, 68°C→ 1min
T7 for AMI f. CD28 rev	siehe oben ATCGATATGGATACAGTTGGTGCAGC	35 Zyklen: 94°C→45sek, 60°C→1min, 68°C→ 1min

Tabelle 3: Zusammenstellung der verwendeten Primer

2.2.4. Klonierung von PCR-Produkten und von DNA-Fragmenten nach einem enzymatischen Verdau

Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe der TA Cloning Kits (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers in die Vektoren pCR2.1 bzw. pCR3.1-Uni kloniert. Dabei werden die durch die Taq-Polymerase an den 3'-Enden der PCR-Produkte angehängten Desoxyadenosin-Reste mit den 3'-seitigen überhängenden Desoxythymidin-Resten des linearisierten Vektors mit Hilfe der T4 DNA Ligase über Nacht bei 14°C ligiert.

DNA-Fragmente, nach der Behandlung mit Restriktionsendonukleasen, wurden mittels Fast-Link Ligase (MBI Fermentas) in die ebenfalls mit Restriktionsendonukleasen verdauten Vektoren kloniert. Die Ligation erfolgte laut Angaben des Herstellers durch Inkubation bei RT (für 10 min bei überhängenden Enden, bzw. für 20 min bei glatten Enden). Die Enzymaktivität wurde durch Inkubation bei 70°C für 15 min inaktiviert. Das Insert: Vektor-Verhältnis betrug 3:1 bis 5:1, je nach Größe des Inserts und des Vektors.

2.2.5. Restriktionsverdau von DNA

Für analytische und präparative Zwecke wurde die DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen (Amersham Biosciences, MBI Fermentas) verdaut. Die Inkubationsbedingungen und Puffer wurden den Angaben der jeweiligen Hersteller entnommen. Die Konzentration der eingesetzten Enzyme betrug mindestens 1 U/ µg DNA/1 Schnittstelle. Die Inkubationszeit betrug normalerweise 1 h, die Inkubationstemperatur war vom jeweiligen Enzym abhängig.

2.2.6. Modifizierung von DNA-Fragmenten

Bei nicht kompatiblen Restriktionsstellen bei einem Insert und einem Vektor wurden die DNA-Fragmente direkt nach dem Verdau mit DNA-Polymerase I Large (Klenow) Fragment (Promega) behandelt. Hierfür wurden dem Verdaueinsatz 10 x Probenpuffer mit dNTPs (2mM) und 1 - 5 Units der Klenow-Polymerase zugefügt. Die Inkubationszeit betrug 15 min (bei RT). Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 75 °C für 10 min gestoppt. Mittels der Klenow-Auffüllreaktion wurden die überhängenden Enden zu glatten Enden umgewandelt. Um die Religation des Vektors zu unterbinden, wur-

de dieser anschließend mit der alkalischen Phosphatase (Promega) behandelt. Die alkalische Phosphatase katalysiert die Hydrolyse von die 5'-Phosphatgruppen von der DNA und verhindert somit die Religation des Vektors. Hierfür wurden dem Ansatz ein 10 x Reaktionspuffer mit 0,01 U vom Enzym / pmol DNA zugefügt und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

2.2.7. Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die DNA-Fragmente wandern aufgrund ihres Molekulargewichtes unterschiedlich schnell in einem horizontalen Agarosegel, an das ein Spannungsfeld angelegt wird. Somit können unterschiedlich lange DNA Fragmente elektrophoretisch getrennt werden. Je nach Länge der zu trennenden Produkte wurde die Agarose (Serva) in einer Konzentration von 0,8 – 1,5 % (w/v) in 0,5 x TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst und nach Abkühlen mit 0,2 µg/ ml Ethidiumbromid versetzt, um die DNA Fragmente im Gel detektieren zu können. Die so behandelte Agarose wurde in die Gelträger-Apparaturen gegossen. Die Proben und der Molekulargewichtsmarker (100 bp, bzw. 1 kb DNA-Leiter; Invitrogen) wurden mit 1/6 des Gesamtprobenvolumens 6x Gelladepuffers versetzt. Das mit den Proben beladene Gel wurde in die mit 0,5x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer (Amersham) überführt und die Elektrophorese wurde für 0,5 h bis 1,5 h bei einer maximalen Spannung von 7 V/cm Elektrodendistanz durchgeführt. Für die Gelauswertung wurde ein UV-Transilluminator (Biostep, Jahnsdorf) verwendet.

2.2.8. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die durch die Agarosegelelektrophorese getrennten DNA-Fragmente wurden mit einem sauberen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem QIAquickTM Gel Extraktion Kit von Qiagen (Hilden) nach den Protokollen der Hersteller isoliert. Die DNA wurde mit H₂O von den in den Kits enthaltenen Säulen eluiert und bei -20°C gelagert.

2.2.9. Transformation kompetenter *E.coli* Bakterien nach Hanahan (1983) [101]

50 µl der kompetenten *E.coli* Zellen (Stamm TO10F') wurden langsam auf Eis aufgetaut, 0,5-1,0 µg der zu übertragenen DNA zupipettiert und vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis und anschließend für exakt 2 min bei 42°C inkubiert. Der Ansatz wurde sofort wieder auf Eis gestellt und nach Zugabe von 950 µl von LB-Medium für 1 h bei 37°C im Schüttler inkubiert. 100 µl und 900 µl der Bakteriensuspension wurden auf Antibiotika-haltigen LB-Agarplatten ausplattiert und für 12-16 h bei 37°C inkubiert.

2.2.10. Plasmidminipräparation aus *E.coli* nach Holmes & Quigley [102]

Eine Einzelkolonie wurde in 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angeimpft und bei 37°C im Schüttler für 12-16 h inkubiert. 1,5 ml der Kultur wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 14000 x g für 1 min bei RT abzentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgesaugt und das Pellet kurz luftgetrocknet. Es wurden 350 µl STET-Puffer zugegeben und gut resuspendiert. Anschließend wurden 25 µl Lysozym zugegeben und durch Vortexen gemischt. Der Ansatz wurde 40 sek gekocht und bei 14000 x g für 10 min abzentrifugiert. Das Sediment, das die Zelltrümmer enthält, wurde mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Es wurden zu dem Überstand 40 µl NaAcetat mit 420 µl Isopropanol zugegeben und bei RT für 5 min inkubiert. Der Ansatz wurde bei 14000 x g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgesaugt und das Sediment mit 400 µl Ethanol gewaschen. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 14000 x g und 4°C für 5 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 5 min luftgetrocknet. Anschließend wurde die DNA in 50 µl TE-Puffer aufgenommen und 2 µl RNaseA zugegeben.

Plasmid-DNA wurden zur Analyse des Inserts mittels eines Restriktionsverdaus herangezogen.

2.2.11. Plasmidmaxipräparation aus *E.coli*

Anhand des Kontrollverdaus ausgewählte Klone wurden zum Animpfen von 100 ml-LB-Kulturen mit entsprechenden Antibiotika-Zusätzen verwendet und nach Inkubati-

on über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator zur Maxi-Präparation der Plasmid-DNA herangezogen. Für die Gewinnung der Plasmid-DNA wurde das Invisorb Plasmid Maxi Kit (Invitek, Berlin) genau nach Anleitung verwendet.

Die Bestimmung der DNA-Konzentration und der Reinheit erfolgten durch Messung der OD bei 260 nm bzw. des Verhältnisses von $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ an einem Spektralphotometer (BioPhotometer; Eppendorf, Hamburg) unter Verwendung spezieller Kunststoffküvetten (Eppendorf). Eine $OD_{260\text{ nm}} = 1$ entspricht 50 µg DNA/ ml, 40 µg RNA/ ml bzw. 30 µg Oligonukleotide/ ml.

2.2.12. Sequenzierung von Nukleinsäuren

Klonierte PCR-Produkte und Vektorkonstrukte wurden unter Voraussetzung des Vorhandenseins entsprechender Bindungsstellen für den Cy5.0 M13 -40 „forward“-Primer und den M13 „reverse“-Primer (Amersham Biosciences), mittels des Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kits (Amersham Biosciences) durch die Kettenabbruchmethode nach dem Originalprotokoll des Herstellers auf beiden DNA-Strängen sequenziert. Zur Analyse der Proben diente ein automatischer DNA-Sequenzierer (ALFexpress; Amersham). Für die elektrophoretische Auftrennung der Produkte (Laufzeit: 900 min, Spannung: 1500 V, Stromstärke: 60 mA, Leistung: 25 W, Temperatur: 55°C, „sample interval“: 2 s) wurde ein spezielles Polyacrylamidgel verwendet, dessen Polymerisation durch UV-Exposition ausgelöst wird (ReproGel Long Read; Amersham). Bei großen Inserts und der Notwendigkeit der Verwendung von insertspezifischen Primern wurde außerdem der kommerzielle Sequenzierservice der Firma GATC Biotech AG (Konstanz) in Anspruch genommen.

2.2.13. Generierung von neuen DNA-Konstrukten

2.2.13.1. Klonierung der variablen Domäne V_H einer schweren IgG1-Kette

Die Sequenz der murinen variablen Domäne V_H einer schweren IgG1-Kette wurde mit Hilfe von hoch degenerierten Primer kloniert. Die als Template eingesetzte cDNA wurde aus murinen Hybridomzellen isoliert. Die Primer wurden so ausgewählt, dass mittels PCR N-terminal die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und C-terminal *Eco*RI eingefügt wurden. Zusätzlich wurde über den C-terminalen Primer ein $(\text{Gly}_4\text{Ser}_1)_3$ -

Linker inseriert. Die Vorwärtsprimer haben die Bezeichnungen IgG1-V_H for1: 5`GGATCCSARGTNMAGCTGSAGSAGTC 3`und IgG1-V_H for2: 5`GGATCCSARGTNMAGCTGSAGSAGTCWGG 3` mit M=A/C, R=A/G, W=A/T, S=G/C, Y=C/T, K=G/T, V=A/G/C, H=A/C/T, D=A/G/T, B=G/C/T und N=A/G/C/T und der Rückwärtsprimer wurde genannt IgG1-V_H rev: 5`GAATTCGTCGACCCTCCGCCACAGACCCTCCGCCACCATAGACAGATGGGGGTGTCTTT TGGC 3`. Die Restriktionsschnittstellen sind kursiv gedruckt. Der PCR-Produkt wurde nach der Ligation in pCR3.1-Uni-Vektor und anschließender Sequenzierung über T7 for und BGH rev Primer in einen pSecTag2B-Vektor über *Bam*HI/*Eco*RI umklontiert.

2.2.13.2. Klonierung der variablen Domäne V_L einer leichten IgG1-Kette

Die Sequenz der murinen variablen Domäne V_L einer leichten IgG1-Kette wurde mit Hilfe von hoch degenerierten Primer kloniert. Die als Template eingesetzte cDNA wurde aus murinen Hybridomzellen isoliert. Die Primer wurden so ausgewählt, dass mittels PCR N-terminal die Restriktionsschnittstellen *Eco*RI und C-terminal *Apa*I eingefügt wurden. Der Vorwärtsprimer hat die Bezeichnung IgG1-V_L for: 5`GAATTCTGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA 3`, der Rückwärtsprimer wurde genannt IgG1-V_L rev: 5`GGGCCCCGGATACAGTTGGTGCAGCATC 3`. Die Restriktionsschnittstellen sind kursiv gedruckt. Der PCR-Produkt wurde nach der Ligation in pCR3.1-Uni-Vektor und anschließender Sequenzierung über T7 for und BGH rev Primer in einen pSecTag2B-V_H-Vektor über *Eco*RI/*Apa*I umklontiert.

2.2.13.3. Klonierung der hFL (humaner „full length“) -BetaC2-Kette

Die Sequenz der humanen konstanten BetaC2-Kette besteht aus 537 Aminosäuren und wurde aus der T-Zellen cDNA kloniert. Spezifische Primer wurden so ausgewählt, dass mittels PCR N-terminal die Restriktionsschnittstellen *Cla*I und C-terminal *Hpa*I und *Kpn*2I eingefügt wurden. Der Vorwärtsprimer hat die Bezeichnung BetaC2 for: 5`GTCGACATCGATGACCTGAAAAACGTGTTCCCACCC 3` und bindet an die komplementäre Region der TCR-Beta-Kette cDNA zwischen der 3. und der 26. Aminosäure. Der Rückwärtsprimer wurde BetaC2 rev genannt: 5`TCCGGAGTTAACGTAGGAGATGAGAAGCAGAGTGAG 3` und bindet an die komplementäre Region der TCR-Beta-Kette cDNA zwischen dem STOP-Kodon (TAG) und der polyA-Sequenz

der konstanten BetaC2-Kette. Die Restriktionsschnittstellen sind kursiv gedruckt. Das gewonnene Amplifikat enthielt Sequenz der gesamten konstanten Domäne der Beta Kette. Der PCR-Produkt wurde nach der Ligation in pCR3.1-Uni-Vektor und anschließender Sequenzierung über T7 for und BGH rev Primer in einen retroviralen pcz-CFG5.1-MCS-Vektor über *ClaI/Kpn2I* umklont.

2.2.13.4. Generierung des chimären AMI-BetaC2 Konstruktes

Für die Generierung des chimären AMI-BetaC2-Konstrukts wurde der scFv „AMI“ (V_H -GlySer-Linker- V_L) mit Hilfe von spezifischen Primern mit pSecTag2B-AMI als Template amplifiziert und in den pCR3.1-Uni-Vektor kloniert. Der Vorwärtsprimer hat die Bezeichnung T7 for: 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3', der Rückwärtsprimer wurde AMI f.BetaC2 rev genannt: 5' ATCGATATGTGCGACGGCGCTATTTCAG 3' und enthält eine *ClaI* Schnittstelle. Die Restriktionsschnittstellen sind kursiv gedruckt. Der somit gewonnene pCR3.1-AMI-Vektor wurde mit *EcoRV* und *ClaI* verdaut und anschließend in den retroviralen Vektor pcz-CFG5.1-BetaC2, ebenfalls mit *EcoRI* (mit zusätzlicher Klenow-Reaktion) und *ClaI* verdaut, umklont.

2.2.13.5. Generierung des chimären AMI-BetaC-CD3 Zeta-Konstruktes

Für die Fusion des chimären AMI-BetaC-Rezeptors mit Transmembran- und intrazellulärer Domänen der Zeta (ζ)-Kette des CD3-Komplexes wurden als erstes die Transmembran- und intrazellulären Domäne der BetaC-Kette mittels spezifischen Primer und dem pcz-CFG5.1-AMI-BetaC Vektor als Template deletiert. Der Vorwärtsprimer hat die Bezeichnung T7 for: 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3', der Rückwärtsprimer wurde BetaC woSTOP rev genannt: 5' GATATCAGACAGGACCCCTTGCTG 3' und enthält eine *EcoRV* Schnittstelle. Das PCR-Produkt wurde direkt in einen pCR2.1-Vektor einkloniert und mit der Zeta-Kette über die *EcoRV* Schnittstelle in frame fusioniert. Hierfür wurden die Transmembran- und intrazelluläre Domänen der Zeta-Kette mit spezifischen Primer und T-Zellen cDNA als Template amplifiziert. Der Vorwärtsprimer hat die Bezeichnung CD3zetaTM/IC for: 5' GATATCGATCCCAAACCTCTGCTACC 3', enthält eine *EcoRV* Schnittstelle und bindet an die komplementäre Region der Zeta-Kette cDNA zwischen der 82. und der 100. Aminosäure. Der Rückwärtsprimer wurde CD3Zeta rev genannt: 5' GATATCTTAGCGAGGGGGCAGGG 3', enthält ebenfalls eine *EcoRV* Schnittstelle und den

STOP-Kodon. Es bindet an die komplementäre Region der Zeta-Kette cDNA zwischen der 486. und der 492. Aminosäure. Die Restriktionsschnittstellen sind kursiv gedruckt. Das PCR-Produkt wurde direkt in den pCR2.1 Vektor einkloniert.

Das generierte AMI-BetaC-CD3 Zeta-Konstrukt wurde über die *NheI* und *XhoI* Schnittstellen und anschließende Klenow-Reaktion kombiniert mit der Behandlung mit der alkalischen Phosphatase in der retroviralen Vektor pcz-CFG5.1-MCS umkloniert. Hierfür wurde der Vektor mit *EcoRI* verdaut und ebenfalls der Klenow-Reaktion und der Behandlung mit der alkalischen Phosphatase unterzogen.

2.2.13.6. Klonierung der hFL (humaner „full length“) -CD28-Kette

Die Sequenz des humanen CD28-Moleküls besteht aus 663 Aminosäuren und wurde aus der T-Zellen cDNA kloniert. Spezifische Primer wurden so ausgewählt, dass mittels PCR N-terminal die Restriktionsschnittstellen *Clal* und *BamHI* und C-terminal *HpaI* und *Kpn2I* eingefügt wurden. Der Vorwärtsprimer hat die Bezeichnung CD28_FL for: 5' *GGATCCATCGATGGAAACAAGATTTTGGTGAAGCAGTCG* 3' und bindet direkt hinter dem Signalpeptid an die komplementäre Region der CD28 cDNA zwischen der 52. und 78. Aminosäure. Der Rückwärtsprimer wurde CD28_FL rev genannt: 5' *TCCGGAGTTAACGCGTCCGTGTCAGGAGCGATAGGC* 3, enthält den STOP-Kodon und bindet an die komplementäre Region der CD28 cDNA zwischen der 649. und der 663. Aminosäure. Die Restriktionsschnittstellen sind kursiv gedruckt. Das gewonnene Amplifikat enthält die Sequenz des gesamten CD28-Moleküls mit dem Stop-Kodon aber ohne das Start-Kodon und die Signalsequenz. Der PCR-Produkt wurde nach der Ligation in pCR3.1-Uni-Vektor und anschließender Sequenzierung über T7 for und BGH rev Primer in einen retroviralen pcz-CFG5.1-MCS-Vektor über *Clal/HpaI* umkloniert.

2.2.13.7. Generierung des chimären AMI-CD28-Konstruktes

Für die Generierung des chimären AMI-CD28-Konstruktes wurde der scFv „AMI“ (V_H-GlySer-Linker-V_L) mit Hilfe von spezifischen Primern mit pSecTag2B-AMI als Template amplifiziert und in den pCR3.1-Uni-Vektor kloniert. Der Vorwärtsprimer hat die Bezeichnung T7 for: 5' *TAATACGACTCACTATAGGG* 3', und der Rückwärtsprimer wurde AMI f.CD28 rev genannt: 5' *ATCGATATGGATACAGTTGGTGCAGC* 3' und enthält eine *Clal* Schnittstelle. Die Restriktionsschnittstelle ist kursiv gedruckt. Der

somit gewonnene pCR3.1-AMI-Vektor wurde mit *EcoRV* und *ClaI* verdaut und anschließend in den retroviralen Vektor pcz-CFG5.1-CD28, ebenfalls mit *EcoRI* (mit zusätzlicher Klenow-Reaktion) und *ClaI* verdaut, umklont.

2.2.13.8. Generierung von löslichem PSCA

Um das lösliche PSCA herzustellen wurde die für PSCA kodierende Sequenz mit Hilfe von spezifischen Primer und pPSCA-IRES2-EGFP (bereitgestellt von Dr. B.Weigle) als Template amplifiziert. Der Vorwärtsprimer hat die Bezeichnung sPSCA for: 5' TTTAAGCTTCTGCTGZGCTACTCCTGC 3', bindet direkt hinter der Signalsequenz an die komplementäre Region der PSCA cDNA zwischen der 61. und der 77. Aminosäure und enthält eine *HindIII* Schnittstelle. Der Rückwärtsprimer wurde sPSCA rev genannt: 5' AAAGGTACCCCGCTGGCGTTGCACAAG 3', bindet vor der GPI-Verankerungssequenz an die komplementäre Region der PSCA cDNA zwischen der 260. und der 288. Aminosäure und enthält eine *KpnI* Schnittstelle. Die Restriktionsschnittstellen sind kursiv gedruckt. Das PCR-Produkt wurde direkt über die *HindIII* und *KpnI* Schnittstellen in den pSecTag2B-Vektor umklont und anschließend mit Hilfe von T7 for und BGH rev Primer sequenziert.

2.2.14. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese

Bei der Natriumlaurylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht getrennt, so dass auch komplexe Proteinmischungen untersucht werden können. Die meisten Proteine binden die Anionen des SDS proportional zu ihrer Molekülgröße, wodurch die Eigenladung des Proteins zu vernachlässigen ist. Zur Auftrennung der Proteine wurde das Tris-HCl/Tris-Glycin-Puffersystem nach der Methode von Laemmli angewendet [103]. Die Konzentration von Acrylamid/ N, N'-Methylenbisacrylamid (19:1; 40 %-ige Stammlösung; Gerbu) im Trenngel wurde je nach Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins gewählt und variierte zwischen 8 % und 12 % (v/v). Als Gelapparaturen dienten Mini-PROTEAN II- und III-Kammern (BioRad). Für die Elektrophorese wurden die Proben mit 5 x SDS-Probenpuffer (reduzierend: mit 2-Mercaptoethanol; nicht reduzierend: ohne 2-Mercaptoethanol) (1/ 5 des Gesamtvolumens) versetzt und 5 – 10 min bei 95°C inkubiert. Die Elektrophorese wurde bei 80 V im Sammelgel und 120 V im Trenngel durchgeführt. Zur Identifizierung der Molekulargewichtsgrößen der Proteine

wurden der Precision Plus Protein Standard Dual Color (BioRad) oder der Rainbow Coloured Protein Molecular Weight Marker (Amersham Biosciences) auf das gleiche Gel wie die zu untersuchenden Proben aufgetragen.

Die aufgetrennten Proteine konnten in den Gelen durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blue G250 sichtbar gemacht werden. Dafür wurden die Gele ungefähr 2 h in Coomassie-Färbelösung geschüttelt und anschließend für mehrere Stunden unter mehrfachem Wechseln der Coomassie-Entfärbelösung inkubiert.

2.2.15. Western Blot und immunochemischer Nachweis

Die während der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine können mit dieser Methode spezifisch nachgewiesen werden. Dafür wurden die Proteine von dem Gel durch einen Elektrottransfer mittels der Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell-Apparatur (BioRad) auf eine Polyvinylidenfluorid- (PVDF) Membran (Fluorotrans Transfer Membrane; Pall; Portsmouth, England) übertragen und immobilisiert. Für den Transfer wurden Filterpapiere, Gel und Membran in einem Blot-„Sandwich“ angeordnet: auf die Anode der Apparatur wurden zunächst vier in Anodenpuffer 1 getränkte Filterpapiere, darauf vier weitere, in Anodenpuffer 2 getränkte Filterpapiere gelegt. Es folgte die Membran, die zunächst in Methanol inkubiert und anschließend in Anodenpuffer 2 äquilibriert wurde, das Gel und acht mit Kathodenpuffer befeuchtete Filterpapiere. Nach Anbringen der Kathode erfolgte der Transfer bei 25 V für 2 h. Anschließend wurde die PVDF-Membran in 3 % BSA (w/v) in TBS über Nacht bei 4°C inkubiert, um eine unspezifische Bindung des Primärantikörpers zu verhindern. Nach Waschschritten mit TBSTT und TBS erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 1 h bei RT. Ungebundener, überschüssiger Primärantikörper wurde durch zwei Waschschrritte mit TBSTT und einem weiteren mit TBS entfernt. Zur Visualisierung der Primärantikörper-Bindung diente ein Meerrettich-Peroxidase- (HRP) markierter Sekundärantikörper, der gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichtet war (Ziege-anti-Maus-HRP oder Kaninchen-anti-Ziege-HRP; DAKO, Darmstadt). Der Nachweis der gebundenen Sekundärantikörper erfolgte nach Waschschrritten mit TBSTT durch Chemilumineszenz mit Hilfe des ECL (Enhanced Chemiluminescence) Plus Western Blotting Detection Reagent (Amersham Biosciences) nach den Angaben des Herstellers, wobei das Signal mit einem lichtempfindlichen Film (Hyperfilm, Amersham Biosciences) detektiert wurde.

2.2.15.1. Phospho-Akt und Akt Nachweis mittels Western Blot

Akt, auch bekannt unter dem Namen Protein Kinase B (PKB) spielt eine wichtige Rolle in der Regulation und Kontrolle der Balance zwischen dem Überleben und der Apoptose der Zelle [104, 105]. Die Phosphorylierung von PKB an Ser473-Rest wird unter anderem durch die Kostimulation der Zellen über das CD28-Molekül und die Aktivierung der PI3K (Phosphoinositol-3-Kinase) induziert. Diese Aktivierung in Form der Phosphorylierung kann mittels monoklonalen Antikörpern (mAk), die spezifisch die phosphorylierte Form erkennen, untersucht werden.

Der chimäre AMI-CD28-Rezeptor wurde hinsichtlich seines Aktivierungspotentials unter Einsatz vom anti-P-Akt Antikörper analysiert. Hierfür wurden Jurkat LV-Zellen (leer Vektor) und Jurkat AMI-CD28-Zellen durch die Kultivierung in mit dem Antigen beschichteten Platten stimuliert. Für die Aktivierungsstudien wurden die Effektorzellen für 48 Stunden in FKS-freiem Medium kultiviert. Bei der Stimulation der Zellen über das anti-CD28 Antikörper bzw. über das sPSCA wurden die 24-well Platte mit einem Kaninchen-anti-Maus Antikörper (10 µg/ml) bzw. anti-*c-myc* Antikörper (10 µg/ml) über Nacht bei 4 °C beschichtet. Einem Waschschrift mit kaltem PBS folgte eine Inkubation mit anti-CD28 Antikörper (2 µg/ml) bzw. mit sPSCA (2 µg/ml) für 1 h bei 37 °C. Nach erneutem Waschschrift erfolgte die Zugabe von den Effektorzellen mit 5×10^5 Zellen/well und Inkubation in FKS-freiem Medium für weitere 2 h bei 37 °C. Die Zellen wurden anschließend gewaschen und für eine Western Blot-Analyse lysiert.

2.2.15.2. Phospho-Zeta-Kette Nachweis mittels Western Blot

Der Zeta-Kette (ζ -Kette) des T-Zell-Rezeptors werden die Signalübertragungseigenschaften zugeschrieben [106, 107]. Die Antigenbindung und Erkennung über den $\alpha\beta$ -Heterodimer führt zur Phosphorylierung der Tyrosinreste innerhalb der ITAM-Sequenzen der ζ -Kette. Die durch die Fyn-Tyrosinkinase phosphorylierte Bereiche binden dann an eine zweite zytosolische Tyrosinkinase, das ζ -assoziierte Protein-70 (ZAP-70), wodurch eine Signalkaskade ausgelöst wird. Der TCR-CD3-Komplex enthält entweder zwei ζ -Ketten oder ein Heterodimer aus einer ζ -Kette und einer η -Kette. Die ζ -Kette und η -Kette unterscheiden sich im C-terminalen Bereich und sind Ergebnis alternativer Spleißereignissen [108]. Die Phosphorylierung der ITAM-Motive innerhalb der ζ -Kette kann mittels spezifischen Antikörper nachgewiesen werden.

Der mAk P-CD3- ζ (C415.9A, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) bindet an den zytoplasmatischen Bereich zwischen der 52. und der 163. Aminosäure der phosphorylierten ζ -Kette.

Der chimäre AMI-BetaC-CD3 Zeta-Rezeptor wurde hinsichtlich seines Aktivierungspotentials unter Einsatz vom anti-P-CD3- ζ Antikörper untersucht. Hierfür wurden Jurkat LV-Zellen und Jurkat AMI-BetaC-CD3 Zeta-Zellen durch die Kultivierung in mit dem Antigen beschichteten Platten stimuliert. Für die Aktivierungsstudien wurden die Effektorzellen für 48 Stunden in FKS-freiem Medium kultiviert. Bei der Stimulation der Zellen über den anti-CD3 Antikörper (Okt3) bzw. über das sPSCA wurden die 24-well Platte mit einem Kaninchen-anti-Maus Antikörper (10 $\mu\text{g/ml}$) bzw. anti-*c-myc* Antikörper (10 $\mu\text{g/ml}$) über Nacht bei 4 °C beschichtet. Einem Waschschrift mit kaltem PBS folgte eine Inkubation mit aCD3 Antikörper (2 $\mu\text{g/ml}$) bzw. mit sPSCA (2 $\mu\text{g/ml}$) für 1 h bei 37 °C. Nach erneutem Waschschrift erfolgte die Zugabe von den Effektorzellen mit 5×10^5 Zellen/well und Inkubation in FKS-freiem Medium für weitere 3 h bei 37 °C. Die Zellen wurden anschließend gewaschen und für eine Western Blot-Analyse lysiert.

2.2.16. Metallchelatchromatographie

Für die Reinigung vom sPSCA und s“AMI“ aus Zellkulturüberstand der transfizierten HEK293-Zellen, wurde der durch molekularbiologische Methoden am C-Terminus angebrachte His₆-Tag genutzt. Dieser Tag ermöglicht die Reinigung des Expressionsproduktes mittels Nickel-Nitrilo-Triessigsäure-Agarose (Ni-NTA; Qiagen, Hilden) als Affinitätsmatrix. Dem Zellkulturüberstand (Load, LD) wurde der 10 x Metallchelatchromatographie-Probenpuffer zugefügt, um die Bindungsaffinität des Proteins an die Matrix zu erhöhen. 100 ml des Überstandes wurden zu 100 μl Ni-NTA, die zuvor mit nicht-denaturierendem Metallchelatchromatographie-Puffer (MC-Puffer) äquilibriert wurde, gegeben und über Nacht bei 4°C auf einem Überkopf-Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Ni-NTA durch Zentrifugation (2000 x g, 5 min, 4°C) sedimentiert und der Überstand mit ungebundenen Proteinen wurde als Durchfluss (Flow Through, FT) bei 4°C gelagert. Die Nickelagarose wurde nun 3 x mit je 2 ml eiskaltem MC-Puffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu eliminieren. Auch die Waschfraktionen (W1 – W3) wurden für die nachfolgende Analyse aufgehoben. Anschließend wurde das Expressionsprodukt mit einem Imidazol-

Gradienten eluiert, wobei das Imidazol mit dem rekombinanten Protein um die Metal-Ionen kompetitiert. Es wurden fünf Elutionsschritten mit je 200 µl MC-Elutionspuffer mit schrittweise steigender Imidazol-Konzentration (50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM) durchgeführt. Zwischen den Wasch- und Elutionsschritten wurde die Agarose jeweils wie oben sedimentiert. Der Proteingehalt der verschiedenen Fraktionen wurde nach der Methode von Bradford [109] mit dem kommerziell erhältlichen Bradford-Reagenz (BioRad) photometrisch bestimmt. Die Erstellung einer Eichgeraden mit einer BSA-Lösung (1 mg/ ml) ermöglichte die direkte Berechnung der Proteinkonzentration. Mittels SDS-PAGE und Coomassie Färbung wurde die Reinheit des aus dem Zellkulturüberstand isolierten Proteins untersucht.

2.3. Zellbiologische Methoden

2.3.1. Bestimmung der Zellzahl

Sedimentierte Zellen wurden in 1 ml Medium resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden 10 µl entnommen und in einem definierten Verhältnis mit Trypanblau gemischt, um beim Zählen der Zellen in der Neubauer-Zählkammer tote Zellen ausschließen zu können. Die lebenden Zellen in mindestens zwei der Großquadrate wurden gezählt und die mittlere Zellzahl bestimmt. Um die Zellzahl/ ml zu bestimmen, wurde folgende Formel angewandt: mittlere Zellzahl x Verdünnungsfaktor x 10^4 .

2.3.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für das Einfrieren wurden die Zellen sedimentiert und in 1 ml eiskaltem FKS/ 10 % Dimethylsulfoxyd (DMSO) (v/v) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde sofort in gekühlte Kryokonservierungsgefäße (1,8 ml) überführt und diese in ein mit 2-Propanol gefülltes Einfriergefäß gegeben, das dann bei -80°C gelagert wurde. Durch die Lagerung in 2-Propanol wurde eine schonende Abkühlung von 1°C/ min gewährleistet. Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen später in Stickstofftanks gelagert.

Um kryokonservierte Zellen in Kultur zu nehmen, wurden die Zellen in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und vorsichtig in FKS aufgenommen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation sedimentiert, der DMSO-enhaltende Überstand wurde voll-

ständig entfernt, bevor die Zellen in entsprechendem Kulturmedium resuspendiert und in Kultur genommen wurden.

2.3.3. Kultivierung und Passagieren von Zelllinien

Die Zelllinien HEK293, HEK293 T und P815 und HT1376 wurden in DMEM kultiviert. Die Kultivierung der Zelllinien Jurkat und J.RT3-T3.5 erfolgte in RPMI. Falls eine Zelllinie mit einem Expressionsvektor kodierend für einen Selektionsmarker transfiziert worden war, wurde dem Medium eine getestete Konzentration des entsprechenden Antibiotikums zugegeben, um das Wachstum von untransfizierten Zellen zu inhibieren. Die Kultivierung sämtlicher Zellen erfolgte in einem Brutschrank mit 5 % CO₂-Begasung bei 37°C.

Das Passagieren von Suspensionszellen erfolgte durch die Entnahme der Zellsuspension aus dem Kulturgefäß, Sedimentierung durch Zentrifugation und Weiterkultivierung eines bestimmten Anteils (1/ 5 bis 1/ 10) der Zellen. Bei Erreichen von 80-90 % Konfluenz wurden die adhären Zellen durch Inkubation mit Trypsin/EDTA bei RT von den Kulturgefäßen gelöst, sedimentiert und in Kulturmedium resuspendiert. Je nach Wachstumsverhalten wurde 1/ 3 bis 1/ 6 der Zellen in die Kulturgefäße für die Weiterkultivierung zurückgegeben.

2.3.4. Transfektion von Zelllinien und Generierung stabiler Klone

Für die Transfektion wurde das Reagenz Lipofectamine 2000 (Invitrogen) eingesetzt, das sich die Bindung von kationischen Lipiden mit negativ geladenen DNA-Molekülen zu Nutzen macht. Der entstehende DNA-Lipid Komplex kann über Endozytose oder Verschmelzung mit der Plasmamembran in die Zelle aufgenommen werden. Den Angaben des Herstellers wurde generell Folge geleistet, wobei die adhären Zellen in Antibiotika-freiem Medium in 6-well Schalen ausplattiert wurden (6×10^5 / Vertiefung), so dass sie nach 24 h Inkubation 90 % Konfluenz erreichten. Die Suspensionszellen wurden am Tag der Transfektion mit 6×10^5 / Vertiefung in einer 24-well-Platte in Antibiotika-freiem Medium ausplattiert. Für den Transfektionsansatz wurden pro Vertiefung 10 µl Lipofectamine 2000 in 250 µl serumfreiem Medium OptiMEM 1 (Invitrogen) verdünnt und in einem gesonderten Gefäß erfolgte die Verdünnung von 5 µg Vektor-DNA ebenfalls in 250 µl OptiMEM 1. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurden die beiden Ansätze vereint und für weitere 20 min bei RT inku-

biert, bevor die Lipid-DNA Komplexe tropfenweise zu den Zellen gegeben wurden. Nach einer Inkubationszeit von 8 h wurden die Zellen mit frischem Medium versorgt. Für die Generierung von stabilen Klonen wurde nach weiteren 40 h das entsprechende Antibiotikum zu dem Kulturmedium gegeben. Die benötigte Konzentration wurde in untransfizierten Zellen durch eine „Killing-Rate“ bestimmt, bei der die Konzentration ermittelt wird, die zum Absterben aller Zellen innerhalb von fünf Tagen führt. Nach ein bis zwei Wochen unter Selektionsdruck wurden die transfizierten Zellen so verdünnt, dass theoretisch eine Zelle in 100 µl Kulturmedium (mit Antibiotikum) enthalten war und diese verdünnte Zellsuspension wurde in 96-well Platten eingesät (200 µl/ well). Nur Einzelzell-Klone wurden expandiert und die Expression des Zielgens wurde analysiert.

2.3.5. Transduktion von humanen Zelllinien

Für den stabilen Transfer von Vektor-DNA in Suspensionszellen wurde eine Transduktion mit Hilfe des Drei-Vektor-Systems nach Soneoka et al. [110] durchgeführt, das auf dem „*Moloney murine leukaemia virus*“ (MoMuLV)-abgeleiteten retroviralen Vektor pcz-CFG5.1-MCS basiert [111]. Der retrovirale Vektor enthält ein Verpackungssignal Ψ , was für die korrekte Verpackung der viralen RNA in Form eines Retrovirus notwendig ist. Das Ψ -Signal ist 5' und 3' flankiert durch retrovirale LTR-Sequenzen („long terminal repeat sequences“), die einen starken Promoter für das gesamte ins Genom integrierte provirale Konstrukt darstellt. Dieser Vektor wird zunächst für die transiente Transfektion von HEK293T-Zellen, die als Verpackungszellen der Viruspartikel dienen, zusammen mit den Vektoren pHIT60, der die Gene *gag* und *pol* enthält und pcz-VSV-Gwt (freundliche Bereitstellung von D. Trono, Universität von Genf), der für das Hüllprotein der viralen Partikel kodiert, unter Verwendung des CalPhos Transfection Kit (BD Clontech), eingesetzt (Abb. 7).

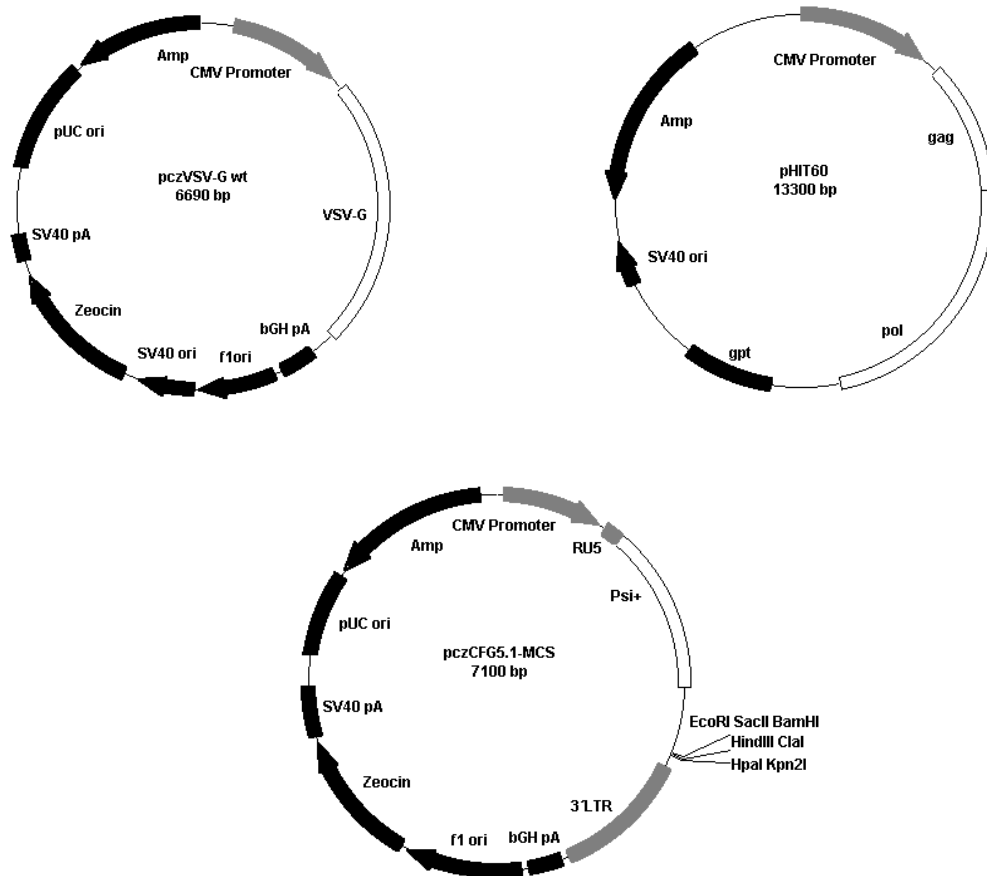


Abb.7 Schematische Darstellung des Drei-Vektor-Systems etabliert für die Transfektion der HEK293 T-Verpackungszellen. Die zusätzliche Transfektion mit den Helferplasmiden pHIT60 und pcz-VSV-Gwt ermöglicht eine transiente Verpackung von replikationsinkompetenten Virionen. Vom retroviralen Vektor werden Transkripte hergestellt, die sowohl translatiert als auch als genomische RNA mit Hilfe der Strukturproteine zu neuen viralen Partikeln verpackt werden, welche von der Verpackungszelllinie freigesetzt werden [112].

Von jeder Plasmid-DNA wurden 10 µg für die Transfektion von 4×10^6 Zellen in einer 100 mm Schale verwendet. 8–12 h nach der Transfektion wurde das Medium durch frisches ersetzt. Am folgenden Tag wurden die transfizierten Verpackungszellen mit 6 ml von frischem Medium, das mit 10 mM Natriumbutyrate versetzt war, für 8 Stunden inkubiert. Dadurch wird die Expression von Genen unter der Kontrolle des CMV-Promotors, den alle drei Vektoren besitzen, verstärkt. Anschließend wurde das Medium erneut durch frisches Medium ohne Natriumbutyrate ersetzt. 48 h und 72 h nach der Transfektion wurden die Überstände der Viruspartikel-produzierenden HEK293 T-Zellen gesammelt und filtriert (45 µm Porengröße) und mit 8 µg/ml Polybren (Hexadimethrinbromid) versetzt. Die geernteten Überstände wurden auf die Zielzellen (Jurkat, J.RT3-T3.5) mit 1×10^5 Zellen/ml, gegeben. Die Transduktion wurde in einer

6-well-Platte mit 3 ml/ Vertiefung, durch eine Zentrifugation der Kulturplatten (2 h, 2400 x g, 30°C) durchgeführt. Am folgenden Tag wurde die Transduktionsprozedur wiederholt.

2.3.6. Generierung monoklonaler Antikörper

Für die Generierung monoklonaler Antikörper wurden entsprechend der Hybridom-technik [38] Antikörper-produzierende Maus-Milzzellen, die nach der Immunisierung entnommen wurden, mit Maus-Myelomzellen der Linie X63Ag8.653 unter Benutzung von Polyethylenglycol (PEG) fusioniert.

Unter der Mithilfe von Frau H. Gebauer und Frau C. Gräfe wurden Mäuse des Stammes C3H x Balb/c F1 mit Zielantigen transfizierten P815 Zellen durch intraperitoneale Injektion immunisiert. Hierfür wurde die murine P815 Zelllinie mittels Lipofectamine 2000 mit dem pPSCA-IRES2-EGFP Vektor transfiziert. Unter einem Selektionsdruck von 1 mg/ml G418 wurden stabile Klone generiert, die kurz vor der Immunisierung mit 9520 cGy (γ Strahlung, Gammacell 3000 Elan Modell I) bestrahlt wurden. Es wurden fünf Immunisierungen im Abstand von vier Wochen durchgeführt, wobei für jede Immunisierung 1×10^7 Zellen eingesetzt wurden.

Für das Screening wurde der Überstand der Hybridomzell-Klone auf seine Reaktivität für das membranständige Antigen auf HEK293 Transfektanten in FACS-Analyse getestet. Klone, die nativ exprimiertes Protein erkannten, wurden rekloniert und nach erneutem Testen expandiert.

2.3.7. Isotypbestimmung monoklonaler Antikörper mittels ELISA

Mit Hilfe von dem Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents Kit (Sigma) wurden die Isotypklassen in einer ELISA („enzyme linked immunosorbent assay“)-Analyse von den PSCA-reaktiven Antikörper bestimmt. Hierfür wurden 96-well-Flachbodenplatten (100 μ l/well) mit unverdünnten bzw. in PBS 1:10 verdünnten positiven Hybridomaüberständen beschichtet. Als negative Kontrolle wurde PBS eingesetzt. Die Platten wurden für 1 Stunde bei 37°C inkubiert und drei Mal mit einem Waschpuffer gewaschen. Nach der Zugabe von den Isotyp-spezifischen Antikörpern (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM, IgA, verdünnt 1:1000 in PBS) wurden die Platten erneut für 30 min bei 37°C inkubiert. Als nächstes wurden die Platten drei Mal mit

dem Waschpuffer gewaschen und mit Peroxidase-markiertem Kanninchen-anti-Ziege Antikörper (verdünnt 1:5000 im Waschpuffer) für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 100 µl/ well von der Substratlösung mit einer TMB-Tablette nach der Vorschrift der Firma Sigma hergestellt, auf die Platte aufgetragen und für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Enzymreaktion wurde mit 50 µl/ well 0,5 M H₂SO₄ abgestoppt, dann erfolgte die Messung des Farbumschlags, der mit der Menge an gebundenem Antikörper korreliert, am Plattenphotometer (Milenia Kinetic Analyser) bei 450 nm und der Referenzwellenlänge 650 nm.

2.3.8. Oberflächen- und intrazelluläre-Zellfärbungen

Die Expression von Oberflächenmolekülen, aber auch die intrazelluläre Expression von den Antigenen bzw. von den Reportergenen wie EGFP und dsRed in den Zellen, wurde unter Verwendung von spezifischen Primärantikörpern und fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern, unter anderem mittels FACS untersucht. Die Oberflächen-Färbung der Zellen (1 x10⁵ Zellen/ Analyse) erfolgte ohne Fixierung in 96-well-Spitzbodenplatten zunächst durch Inkubation für 45 min auf Eis mit dem Primärantikörper. Als Kontrolle wurden unspezifische Antikörper des gleichen Isotyps eingesetzt. Nach einem Waschschrift mit eiskaltem PBS erfolgte die Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper ebenfalls für 45 min auf Eis im Dunkeln. Es wurden Antikörper mit den Fluoreszenzfarbstoffen Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) und Indocarbocyanin (Cy3) verwendet. Nach einem Waschschrift mit eiskaltem PBS wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt und an dem FACScan (Becton Dickinson, Heidelberg) analysiert.

Für die intrazelluläre Färbung wurden die Zellen direkt auf Deckgläschen mit 2 x 10⁵ Zellen/Analyse einen Tag vor der Färbung ausplattiert. Als erstes wurden die Zellen mit 4% PFA für 20 min auf Eis fixiert. Nach einem Waschschrift mit kaltem PBS wurden die Zellen mit 0,1% Saponin für weitere 20 min auf Eis permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen und mit dem Primärantikörper für 45 min auf Eis inkubiert. Als Kontrolle wurden unspezifische Antikörper des gleichen Isotyps eingesetzt. Nach einem Waschschrift mit eiskaltem PBS erfolgte die Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper ebenfalls für 45 min auf Eis im Dunkeln. Für die Aufnahmen wurden die Zellen zusätzlich einer Hoechst 33342-Kernfärbung (Hoechst, 1µg/µl, verdünnt 1:1000 in PBS) bzw. einer Propidiumiodid-

Kernfärbung (Sigma, 1 µg/µl, verdünnt 1:1000 in PBS) unterzogen. Hierfür wurden die Zellen für 5 min auf Eis mit dem verdünnten DNA-Farbstoff inkubiert und anschließend mit kaltem PBS gewaschen.

2.3.9. Bindung von löslichem „AMI“ (sAMI) an die PSCA-positiven Zellen

Der generierte scFv „AMI“ wurde in einem „AMI“-Bindungsassay hinsichtlich seiner Bindungseigenschaften an PSCA analysiert. Hierfür wurden die HEK293 PSCA-IRES2-EGFP-Zellen und HEK293 LV-Zellen bzw. die HT1376 Zelllinie mit 5×10^5 Zellen/Analyse mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit sAMI (10 µg/ml) für 45 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Waschschrift erfolgte die Inkubation mit einem anti *c-myc* Ak (10 µg/ml) für 2 Stunden auf Eis. Zur Detektion wurden die Zellen mit einem fluoreszenzmarkierten Ziege-anti-Maus Ak für 45 min auf Eis inkubiert. Schließlich wurden die Zellen in PBS aufgenommen und mittels FACS analysiert bzw. für die Aufnahmen in warmen Glycerin (Merck) aufgenommen und auf Objektträger aufgetragen.

2.3.10. Bindung von löslichem PSCA (sPSCA) an den chimären Rezeptor

Die Bindungseigenschaften der neu konstruierten chimären Rezeptoren wurde in einem PSCA-Bindungsassay analysiert. Hierfür wurden die HEK293 AMI-chimärer Rezeptor-Zellen und HEK293 LV-Zellen bzw. J.RT3-T3.5 AMI-chimärer Rezeptor-Zellen und J.RT3-T3.5 LV-Zellen mit 5×10^5 Zellen/Analyse mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit sPSCA (10 µg/ml) für 45 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Waschschrift erfolgte die Inkubation mit einem anti-*c-myc* Ak (10 µg/ml) für 2 Stunden auf Eis. Zur Detektion wurden die Zellen mit einem fluoreszenzmarkierten Ziege-anti-Maus Ak für 45 min auf Eis inkubiert. Schließlich wurden die Zellen in PBS aufgenommen und mittels FACS analysiert bzw. für die Aufnahmen in warmen Glycerin (Merck) aufgenommen und auf Objektträger aufgetragen.

Die Aufnahmen wurden entweder an einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (MRC-1024, BioRad) oder an einem Umkehr-Mikroskop (IX70 Olympus) durchgeführt.

2.3.11. Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Bei der FACS-Analyse werden die Zellen über eine Stahlkapillare durch Überdruck in die Messküvette eingeführt, durch hydrodynamische Fokussierung verengt sich der Probenstrom auf das Zentrum der Küvette, wobei gewährleistet wird, dass die Zellen einzeln den Messpunkt passieren, an dem ein fokussierter Laserstrahl auf die Zellen trifft, wobei die Zelle aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften das Licht streut. Somit kann man Größe (forward scatter, FCS) und Granularität (side scatter, FSC) unterschiedlicher Zellen unterscheiden. Gleichzeitig wird das durch die gebundenen, fluoreszenzmarkierten Antikörper emittierte Licht gemessen, wobei die Expressionsstärke des zu untersuchenden Proteins mit der Fluoreszenzintensität korreliert. Die Auswertung der FACS-Daten erfolgte mit Hilfe der WinMDI Software.

3. Ergebnisse

3.1. Generierung eines neuen hochaffinen monoklonalen Antikörpers gegen die extrazelluläre Domäne von PSCA

3.1.1. Transfektion von P815-Zellen mit pPSCA-IRES2-EGFP-Vektor

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Generierung von neuen PSCA-spezifischen Therapeutika in Form von chimären Rezeptoren für die Behandlung des hormonrefraktären Prostatakarzinoms. Für die Konstruktion der chimären, PSCA-spezifischen Rezeptoren musste zunächst ein PSCA-reaktiver Antikörper generiert werden. Hierfür wurden die murinen H-2^d positiven Mastozytomzellen P815 mit dem pPSCA-IRES2-EGFP-Vektor transfiziert. Dieser Vektor enthält die gesamte kodierende Sequenz des humanen PSCA mit 372 bp, die bicistronisch über die IRES2-Sequenz mit der kodierenden Region für EGFP transkribiert und translatiert wird. Die Transfektion erfolgte mittels Lipofektion. Unter Verwendung von G418 (1 mg/ml) wurden die Zellen selektioniert und anschließend stabile Klone generiert. Diese wurden anhand der Koexpression von EGFP im FACS ermittelt (Abb. 8A.).

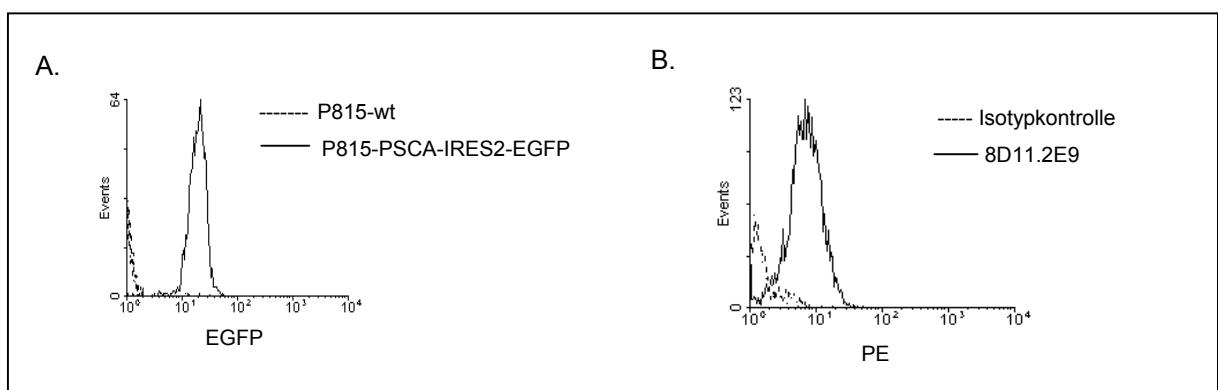


Abb.8 Durchflusszytometrische Analyse der EGFP-Expression in transfizierten P815-Zellen. Die PSCA-positiven P815-Zellen sind mit durchgehender schwarzer Linie und die P815-wt-Zellen mit gestrichelter Linie dargestellt (**A.**). Analyse der Oberflächenexpression von PSCA auf transfizierten P815-Zellen unter Einsatz des 8D11.2E9 anti-PSCA Ak (10 µg/ml) und eines Ziege-F(ab)₂-anti-Maus Ig-PE Ak (10 µg/ml) (durchgehende schwarze Linie) (**B.**). Eine Isotypkontrolle (gestrichelte Linie) wurde mitgeführt.

Für die Bestimmung der auf der Zelloberfläche am stärksten PSCA-exprimierenden Klone wurde ebenfalls eine FACS-Analyse durchgeführt. Hierfür wurden die generierten Klone mit einem anti-PSCA Antikörper (8D11.2E9, freundlicherweise zur Verfügung gestellt vom Genentech, Inc., South San Francisco) nativ gefärbt (Abb. 8B.). Die mittels einer durchflusszytometrischen Analyse ermittelten PSCA-positiven Klone wurden anschließend für die Immunisierung der Mäuse expandiert.

3.1.2. Immunisierung von C3H x Balb/c F1-Mäusen mit P815 PSCA-positiven Zellen und Hybridom-Screening

Für die Gewinnung der Hybridomzelllinien wurden insgesamt fünf H-2^d positive C3H x Balb/c F1-Mäuse über einen Zeitraum von sechs Monaten immunisiert. Die fünffache Immunisierung der Mäuse mit den an der Oberfläche PSCA-exprimierenden P815-Zellen, und die Fusion der isolierten Milzzellen mit Maus-Myelomzellen der Linie X63Ag8.653 resultierte in der Generierung von PSCA-reaktiven Antikörpern. Zur Erfolgskontrolle der Immunisierungen wurden die Seren von immunisierten Mäusen mit dem Prä-Immunisierungsserum in einer FACS-Analyse mit P815-wt- und P815-PSCA-Zellen getestet. Bereits nach dem 1. Boost konnte eine deutliche anti-PSCA Reaktivität der Seren von immunisierten Mäusen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der instabilen PSCA-Expression auf der Oberfläche der P815-Zellen wurden für das Screening der Hybridom-Überstände die HEK293-PSCA-Zellen eingesetzt. Die HEK293-Zellen wurden im Vorfeld mit dem pPSCA-IRES2-EGFP Vektor mittels Lipofectamine 2000 transfiziert und anschließend mit 0,5 mg/ml G418 selektioniert. Die anhand des EGFP-Signals (Abb. 9A.) und der PSCA-Oberflächenexpressionsanalyse (Abb. 9B.) ermittelten Klone wurden einer nativen Färbung mit rund 900 Hybridom-Überständen unterzogen. Es wurden insgesamt drei Antikörper 7F5, 8A7 und 10A8 isoliert. Aufgrund der sehr hohen Bindungsstärke wurden die weiteren Experimente mit dem monoklonalen Antikörper 7F5 durchgeführt (Abb. 9C.).

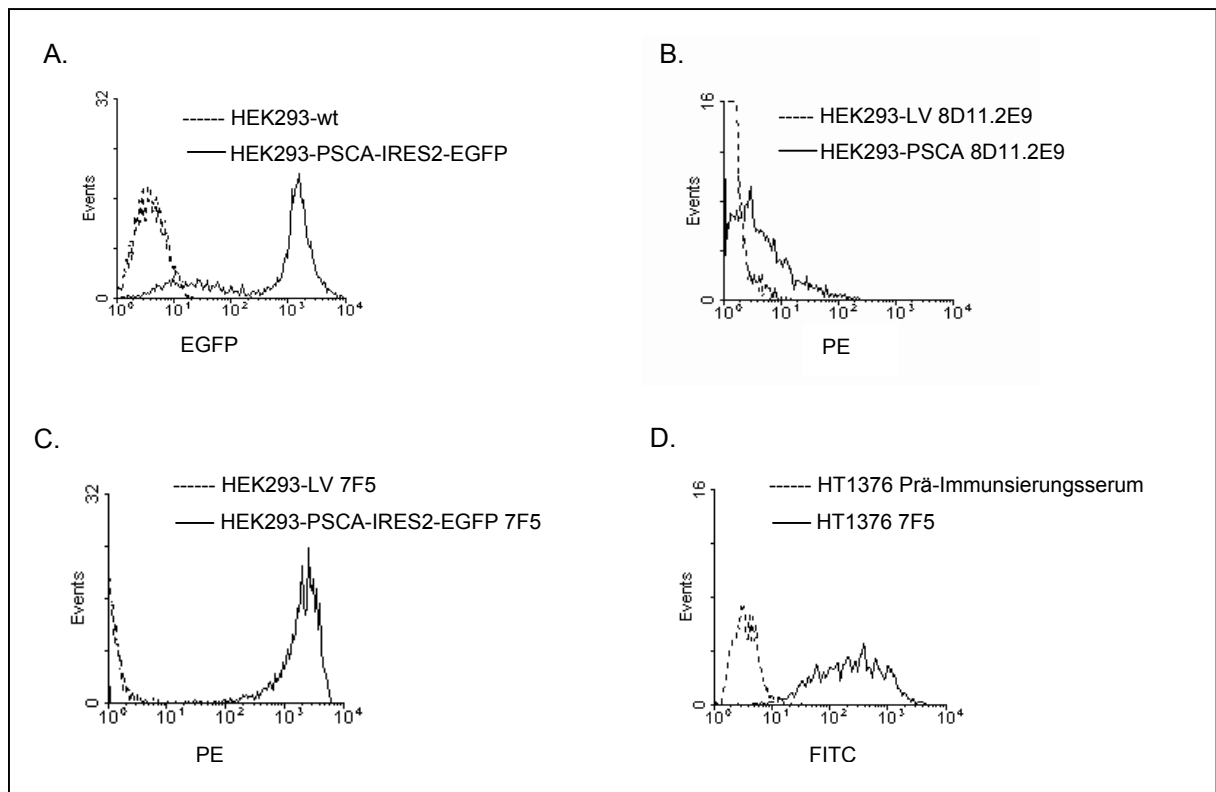


Abb.9 Durchflusszytometrische Analyse der EGFP-Expression in transfizierten HEK293-PSCA-Zellen. Die PSCA-positiven HEK293-Zellen sind mit durchgehender schwarzer Linie und die HEK293-wt-Zellen mit gestrichelter Linie eingezeichnet **(A.)**. Analyse der Oberflächenexpression von PSCA auf transfizierten HEK293-PSCA-Zellen unter Einsatz des mAk 8D11.2E9 (10 µg/ml) **(B.)** und des mAk 7F5 (10 µg/ml) **(C.)**, zur Detektion der Bindung wurde der Ziege-F(ab)²-anti-Maus Ig-PE Ak (10 µg/ml) genutzt. Die PSCA-positiven Zellen sind mit durchgehender schwarzer Linie eingezeichnet. Als negative Kontrolle wurden HEK293-LV-Zellen (gestrichelte Linie) mitgeführt.

Native PSCA-Oberflächenexpressions-Analyse auf HT1376-Zellen mit dem mAk 7F5 (10 µg/ml) und dem Ziege-F(ab)²-anti-Maus Ig-FITC Ak (10 µg/ml) Antikörper (schwarze durchgehende Linie). Als negative Kontrolle wurden die HT1376-Zellen mit dem Prä-Immunsierungsserum (unverdünnt) gefärbt (gestrichelte Linie) **(D.)**.

Der neu generierte 7F5 Ak zeigte eine deutlich höhere Bindungsstärke im Vergleich zu der des kommerziellen 8D11.2E9 Antikörpers (MFI von 10^3 vs. 10^1 bei identischer Konzentration). Der monoklonale anti-PSCA 7F5 Antikörper wurde zusätzlich auf einer HT1376 Zelllinie (humanes Harnblasenkarzinom), die nativ PSCA auf ihrer Zelloberfläche exprimiert, in der FACS-Analyse (Abb. 9D) und in der Umkehr-Mikroskopie (Abb. 10) hinsichtlich seiner Bindungsaktivität getestet. Trotz der Fixierung der Zellen mit 4%-igem PFA konnte das PSCA hauptsächlich an der Zelloberfläche detektiert werden. Die für eine Oberflächenexpression typische

Ringfluoreszenz wurde demonstriert, indem die HT1376-Zellen in Suspension aufgenommen und anschließend ohne zusätzliche Fixierung mit dem anti-PSCA Antikörper gefärbt wurden (Abb. 11).

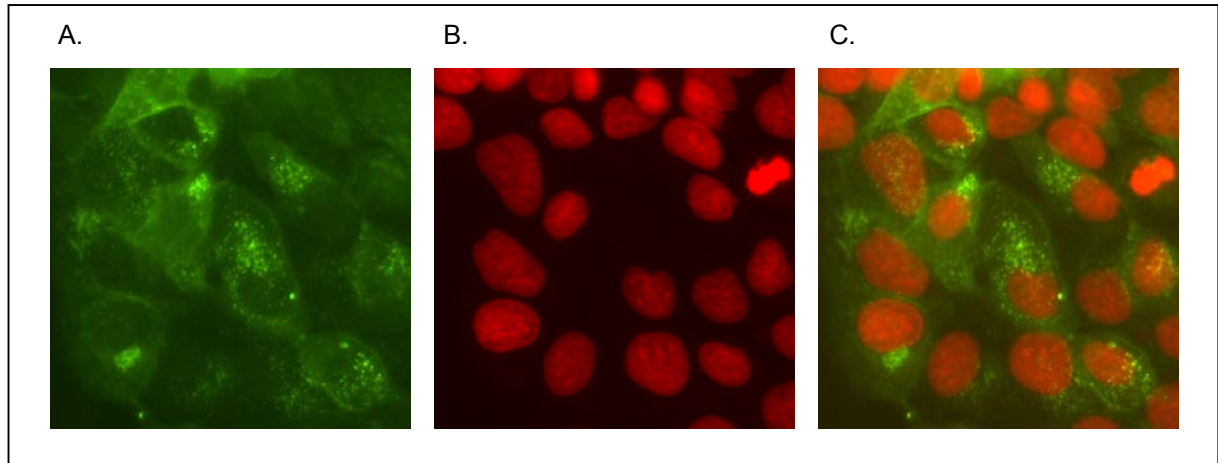


Abb.10 PSCA-Expressionsanalyse auf HT1376-Zellen wurde mittels der Fluoreszenz-Mikroskopie durchgeführt. Die mit 4%PFA auf Deckgläschen fixierten Zellen wurden mit dem mAk 7F5 (10 $\mu\text{g/ml}$) und einem FITC-markierten Ziege-anti-Maus Ig Ak (10 $\mu\text{g/ml}$) gefärbt (A.). Die Kerngegenfärbung wurde unter Einsatz von Propidiumiodid durchgeführt (B.). Die Überlagerung von (A.) und (B.) ist in der Abbildung (C.) dargestellt.

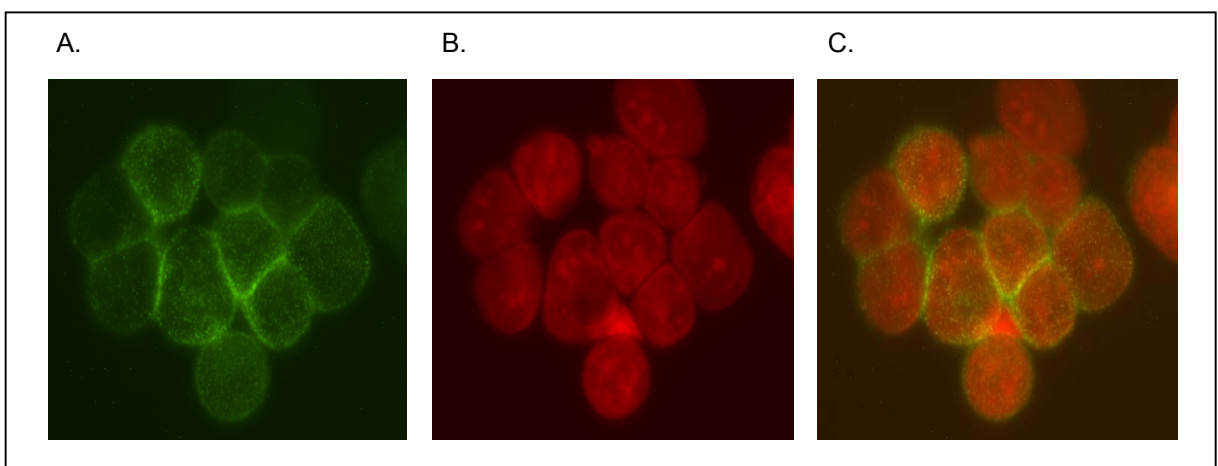


Abb.11 Native PSCA-Expressionsanalyse auf HT1376 Zellen wurde mittels der Fluoreszenz-Mikroskopie durchgeführt. Die Zellen wurden in Suspension mit dem mAk 7F5 (10 $\mu\text{g/ml}$) und einem FITC-markierten Ziege-anti-Maus Ig Ak (10 $\mu\text{g/ml}$) gefärbt (A.). Die Kerngegenfärbung wurde unter Einsatz von Propidiumiodid durchgeführt (B.). Die Überlagerung von (A.) und (B.) ist in der Abbildung (C.) dargestellt.

Mit Hilfe des Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagent Kits (Sigma) wurde die Isotypklasse des neu generierten mAk 7F5 als IgG1 eindeutig bestimmt. Die

durchflusszytometrischen und mikroskopischen Bindungsanalysen mit dem generierten anti-PSCA mAk 7F5 zeigten eine starke PSCA-Reaktivität sowohl auf den transfizierten HEK293-Zellen als auch auf der Blasenkarzinomzelllinie HT1376.

3.2. Generierung eines anti-PSCA Einzellketten-Antikörpers (scFv)

3.2.1. Klonierung der variablen Regionen des anti-PSCA Antikörpers

Um den Einzelkettenantikörper („single chain“ Antikörper, scFv) zu konstruieren, wurden die variablen Regionen des mAk 7F5 kloniert. Dazu wurde im ersten Schritt die gesamte RNA aus dem Hybridomzellklon 7F5 isoliert. Die reverse Transkription wurde mit Hilfe des spezifischen IgG1-V_H rev Primers für die schwere Kette und des IgG1-V_L rev Primers für die leichte Kette durchgeführt. Beide Primer binden im 5'-Bereich der jeweiligen konstanten Domäne C_H1 bzw. C_L, wodurch eine geeignete Matrize für anschließende PCR-Reaktion erhalten wurde. Die für die Amplifikation der variablen Regionen der murinen Antikörper eingesetzten, hoch degenerierten Primer wurden anhand der bereits im Jahre 2000 vom Wang et al. publizierten Primersets konstruiert [113]. Diese wurden für die anschließende Klonierung in den pSecTag2B-Vektor mit geeigneten Schnittstellen modifiziert (Abb. 12).

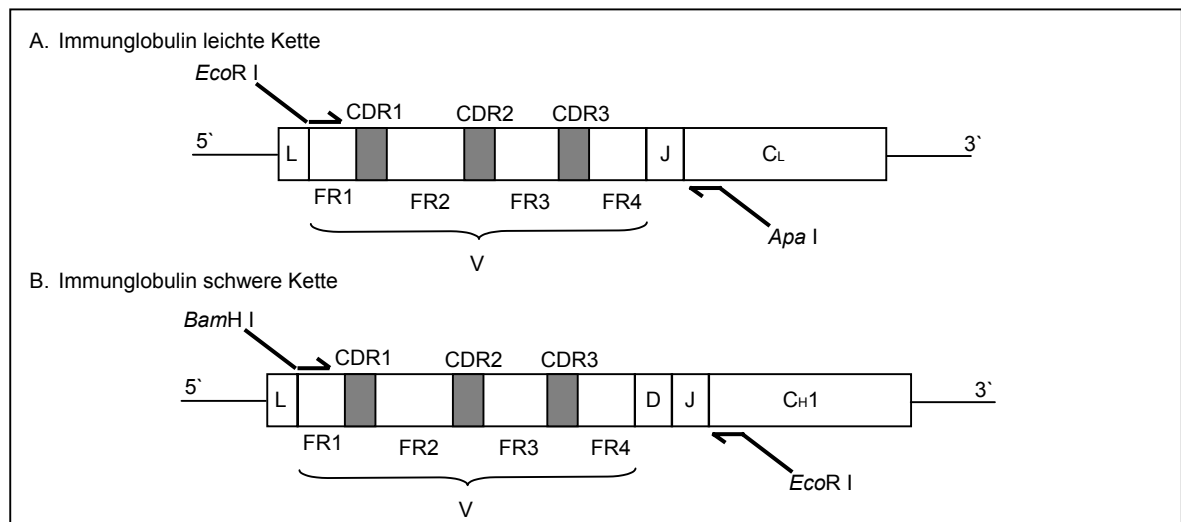


Abb.12 Isolationsschema der variablen Regionen der leichten (A.) und schweren (B.) Ketten-Sequenzen. Die Vorwärtsprimer (als Pfeile dargestellt) binden an die komplementären Regionen im 5'-Bereich innerhalb der FR1-Sequenzen. Die Rückwärtsprimer binden an die komplementären Regionen im 5'-Bereich der konstanten C-Domäne.

Abkürzungen: **C** constant region; **CDR** complementarity determining region; **D** diversity region; **FR** framework region; **J** joining region; **L** leader sequence; **V** variable region.

Aufgrund der hohen Variabilität innerhalb der murinen Ig-Sequenzen wurden für die Amplifikation der variablen schweren Kette zwei verschiedene Primer-Kombinationen verwendet (IgG1-V_H for 1 mit IgG1-V_H rev Spur 3 bzw. IgG1-V_H for 2 mit IgG1-V_H rev Spur 5, Abb. 13). Die PCR-Reaktion resultierte in beiden Fällen in einer distinkten Bande auf der Höhe von ca. 450 bp. Die Isolierung der variablen leichten Kette wurde unter Verwendung von einem Primer-Paar (IgG1-V_L for und IgG1-V_L rev), bei unterschiedlichen Annealing-Temperaturen durchgeführt. Als Ergebnis konnte sowohl bei 50°C (Spur 2) als auch 60°C (Spur 3) eine distinkte Bande auf der Höhe von ca. 350 bp detektiert werden (Abb. 13).

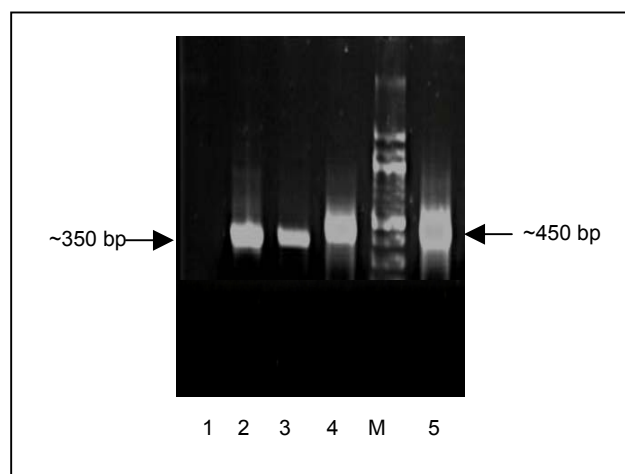


Abb.13 PCR-Amplifikation der variablen leichten Kette V_L (Spuren 2 und 3) und der variablen schweren Kette V_H (Spuren 4 und 5) mit hoch degenerierten Primer und unterschiedlichen Annealing-Temperaturen. Die negative Kontrolle (Wasserprobe) wurden in der Spur 1 mitgeführt. Als DNA-Marker (M) wurde der 100 bp Marker (Invitrogen) verwendet.

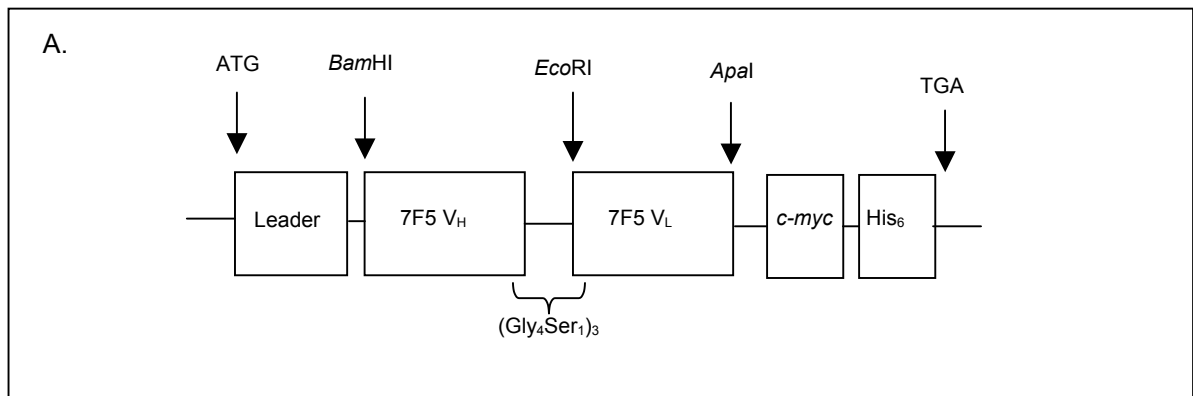
Die PCR-Produkte wurden in den pCR3.1-Uni-Vektor kloniert. Um festzustellen, dass die isolierten Fragmente tatsächlich nur von einem monoklonalen Antikörper stammen, wurden jeweils zehn Klone von jeder Kette für die Sequenzanalyse herangezogen. Mittels der Software HUSAR (Heidelberg, Deutschland) wurde eine vergleichende Sequenzanalyse (multiple alignment) durchgeführt. Die analysierten Sequenzen zeigten eine nahezu 100%-ige Sequenz-Identität. Die vorhandenen Unterschiede beschränkten sich auf den Bereich des PCR-Vektors (Daten nicht gezeigt). Im Weiteren wurden die isolierten Sequenzen der V_H- und V_L-Ketten hinsichtlich der Zugehörigkeit zu einer der murinen Immunglobulin-Gruppen analysiert. Die Sequenzanalyse erfolgte mit der Datenbank *IgBlast* (NCBI, National Centre for Biotechnology Information, National Library of Medicine, Bethesda, USA).

[114]). Diese Datenbank enthält Keimbahngene der Maus, die Informationen über die Ähnlichkeiten einer Antikörpersequenz mit Maus-Ig liefern. Die isolierten Sequenzen von den variablen Regionen wurden jeweils separat in die Datenbank eingegeben und analysiert. Die Sequenz einer variablen Region wird dabei in die CDR- und FR-Regionen unterteilt, deren Größe und Aminosäurezusammensetzung mit denen von den in der Datenbank gespeicherten Aminosäuresequenzen verglichen werden. Die variable schwere Kette wurde aufgrund einer 93%-igen Übereinstimmung mit der bereits publizierten VH69.1-Subgruppe dieser zugeordnet [115]. Durch die ebenfalls eindeutigen Identität von 93% innerhalb der D-Region zur DFL16.1-Subgruppe [116] und von 95% im Bereich des J-Gensegments zu der JH1-Subgruppe [117] konnte die isolierte Sequenz als die für eine variable, schwere Kette kodierende DNA identifiziert werden. Die *IgBlast*-Analyse der isolierten leichten variablen Ketten zeigte als Ergebnis eine 92%-ige Übereinstimmung mit der bereits publizierten Immunglobulin kappa cp9-Subgruppe [118] und eine 100%-ige Identität innerhalb des J-Gensegments zur JK1-Subgruppe [119] (siehe Anhang). Eine 100%-ige Identität mit den bereits publizierten Antikörpersequenzen ist aufgrund der ausgeprägten Hypervariabilität innerhalb der VDJ-Regionen der schweren und der VJ-Regionen der leichten Kette, die durch die somatischen Rekombinationen der Gensegmente und durch die Punktmutationen im Laufe der Affinitätsreifung zustande kommt, ausgeschlossen.

3.2.2 Konstruktion eines anti-PSCA Einzelkettenantikörpers

Um einen Einzelkettenantikörper (scFv) zu generieren, wurden die isolierten V_H- und V_L-Sequenzen in dem pSecTag2B-Vektor zusammengefügt. Die mit dem IgG1-V_H rev Primer eingeführte Linkersequenz von 15 Aminosäuren sorgt für die notwendige Flexibilität und erlaubt die funktionelle Assoziation der beiden Domänen. Für die Komposition des Linkers hat sich die Aminosäuresequenz (Gly₄Ser₁)₃ als günstig herausgestellt [120, 121]. Durch die Einführung des Linkers bleiben die nativen Bindungseigenschaften des Antikörpers und somit auch die Bindungsspezifität erhalten. Die offenen Leserahmen der V_H- und V_L-Domänen wurden nacheinander im Leserahmen mit den im pSecTag2B-Vektor enthaltenen Start- und Stop-Kodons einkloniert. Das so entstandene Konstrukt enthielt durch den Vektor eine murine Ig-kappa (Ig-κ) Leadersequenz, die für die Sekretion des Einzelkettenantikörpers ins

Medium notwendig ist. Ein weiterer Vektorbestandteil war das *c-myc*-Epitop, das die Detektion des Proteins erlaubte, und C-terminal der Histidin-Tag (His_6) für die Reinigung des Proteins aus dem Zellkulturüberstand. Abbildung 14 zeigt schematisch die Anordnung der variablen Domänen mit den Vektorelementen und die gesamte Nukleotidsequenz des neu generierten „AMI“ genannten scFv.



B.	
1	ATG GAG ACA GAC ACA CTC CTG CTA TGG GTA CTG CTG CTC TGG GTT CCA GGT TCC ACT GGT GAC GCG M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G D A
70	GCC CAG CCG GCC AGG CGC GCG CGC CGT ACG AAG CTT GGT ACC GAG CTC A Q P A R R A R R T K L G T E L
118	<i>Bam</i> HI IgG1-V _H for1 Primer GGA TCC CAG GTG AAG CTG CAG GAG TCT GGG GGA GGT TTA GTG CAG CCT GGA GGG TCC CTG AAA G S Q V K L Q E S G G G L V Q P G G S L K
181	CTC TCC TGT GTA GCC TCT GGA TTC ACT TTC AGT TCC TAT ACC ATG TCT TGG GTT CGC CGG ACT CCA L S C V A S G F T F S S Y T M S W V R R T P
245	GAG AAG AGG CTG GAA TGG GTC GCA TAC ATT CAT AAT GGT GGT GGT CAC ACC TAC TAT CCA GAC ACC E K R L E W V A Y I H N G G G H T Y Y P D T
313	ATA AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC ACC CTG TTC CTG GAA ATG AGC AGT I K G R F T I S R D N A K N T L F L E M S S
445	CTG AAG TCT GAA GAC ACG GCC ATG TAT TAC TGT ACA AGA CGA ATG TAC TAC GGT AAT AGC CAC TGG L K S E D T A M Y Y C T R R M Y Y G N S H W
511	TAC TTC GAT GTC TGG GGC GCA GGG ACC TCG GTC ACC GTC TCC TCA Y F D V W G A G T S V T V S S
556	IgG1-V _H rev Primer mit (Gly ₄ Ser ₁) ₃ -Linker GCC AAA ACG ACA CCC CCA TCT GTC TAT GGT GGC GGA GGG TCT GGT GGC GGA GGG TCT GGT GGC A K T T P P S V Y G G G G S G G G S G G
619	<i>Eco</i> RI IgG1-V _L for GGA GGG TCG ACG AAT TCT TCC TCC CTG TCT GCC TCT CTG G G S T N S D I V M T Q S P S S L S A S L
682	GGC GAC AGA GTC ACC ATC AAT TGC AGG ACA AGC CAG GAC ATT AGC AAC TAT TTA AAC TGG TAT CAG G D R V T I N C R T S Q D I S N Y L N W Y Q
748	CTG ACA CCA GAT GGA ACT GTT AAA CTC CTG ATC TAC TAC ACA TTA AAA TTA AAT TCA GGA GTC CCA L T P D G T V K L L I Y Y T L K L N S G V P
814	TCA AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAT TAT TCT CTC ACC ATT AAC AAC CTG GAG AAA GAG S R F S G S G S G T D Y S L T I N N L E K E
880	GAT TTT GCC ACT TAT TTT TGC CAA CAG AGT AAA ACA CTT CCG TGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG D F A T T Y F C Q Q S K T L P W T F G G G T K
946	CTG GAA ATC AAG CGG GCT L E I K R A
964	IgG1-V _L rev <i>Ap</i> al GAT GCT GCA CCA ACT GTA TCC GGG CCC GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT AGC GCC D A A P T V S G P E Q K L I S E E D L N S A
1030	GCT GAC CAT CAT CAT CAT CAT CAT TGA A D H H H H H H *

Abb.14 (A.) Schematische Darstellung des scFv Konstruktes „AMI“ in dem pSecTag2B-Vektor. Die variable schwere Kette V_H des 7F5 Antikörpers mit der (Gly₄Ser₁)₃-Linkersequenz wurde mittels *Bam*HI und *Eco*RI in den pSecTag2B-Vektor einkloniert. Im nächsten Schritt wurde die variable leichte Kette V_L des 7F5 Antikörpers mittels *Eco*RI und *Ap*al in den pSecTag2B-V_H-Vektor einkloniert.

(B.) Nukleotidsequenz als Trinukleotidfolge im korrekten Leseraster mit Aminosäuresequenz des Einzelkettenantikörpers „AMI“ in dem pSecTag2B-Vektor mit markierten Primersequenzen und den VDJ-Gensegmenten (grau, grün und violett hinterlegt)

der schweren Kette und den VJ-Genesegmenten (rot und blau hinterlegt) der leichten Kette.
 Abkürzungen: **ATG** Start-Kodon; **Leader** murine Ig-kappa Leadersequenz; **7F5 V_H** variable schwere Kette des 7F5 Antikörpers; **(Gly₄Ser₁)₃** Linkersequenz; **7F5 V_L** variable leichte Kette; **c-myc** für ein *c-myc*-Epitop kodierende Sequenz; **His₆** aus sechs aufeinanderfolgenden Histidinen bestehender Tag; **TGA** Stop-Kodon.

3.2.3. Expression des anti-PSCA scFv „AMI“ im eukaryotischen System

Zur Untersuchung der Funktionalität vom scFv „AMI“ wurde der neu generierte pSecTag2B-AMI-Vektor nach einer Kontrollsequenzierung in die HEK293-Zellen eingebracht. Hierfür wurden die HEK293-Zellen mittels Lipofectamine 2000 mit dem Vektor transfiziert und anschließend mit Zeocin (0,3 mg/ml) selektioniert. Die dadurch isolierten Zellen wurden kloniert und expandiert. Mittels einer Western Blot-Analyse wurde die Effizienz der Zellen hinsichtlich der Proteinproduktion und Sekretion des Zielproteins ins Zellmedium untersucht. Hierfür wurden die Zellüberstände der mit pSecTag2B-AMI- bzw. mit pSecTag2B-Vektor (LV) transfizierten Zellen gesammelt und in einer 12% SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Detektion des Proteins erfolgte unter Verwendung des anti-*c-myc* und des anti-Penta-His Antikörpers (Abb. 15).

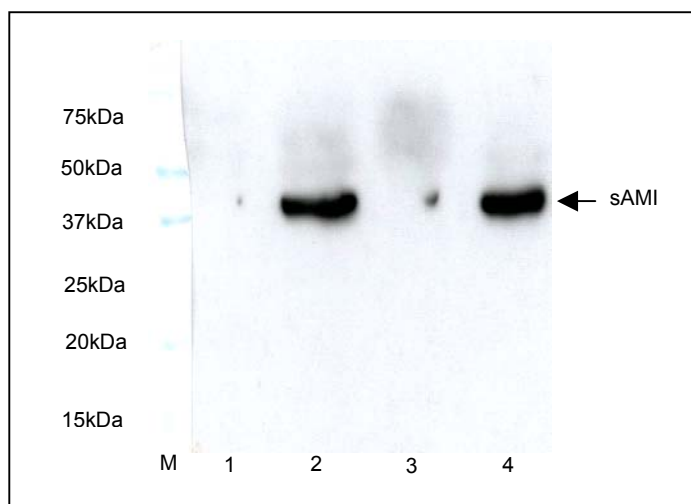


Abb.15 SDS-PAGE mit Zellüberständen von mit pSecTag2B-AMI- („sAMI“) und pSecTag2B-Vektor (LV) transfizierten HEK293-Zellen. Auftrennung von je 20 µl Zellüberstand auf einem 12% Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen, anschließende Entwicklung mit anti-*c-myc* (200 ng/ml) bzw. anti-Penta-His (100 ng/ml) Antikörpern und Kaninchen-anti-Maus-HRP (1 µg/ml) Sekundär-Antikörper. Spur 1: HEK293-LV mit anti-*c-myc* Ak; Spur 2: HEK293-sAMI mit anti-*c-myc* Ak; Spur 3: HEK293-LV mit anti-Penta-His Ak; Spur 4: HEK293-sAMI mit anti-Penta-His Ak; M Dual Color Proteinmarker (Biorad).

Die auf der Höhe von ca. 37 kDa detektierte Bande entspricht der erwarteten Größe des Proteins. Das Molekulargewicht eines scFv wird auf ungefähr 30 kDa geschätzt. Das angehängte *c-myc* Epitop und der His₆-Tag fügen zusätzlich 5-7 kDa zu. Der am C-Terminus des Proteins eingeführte His₆-Tag ermöglichte eine einfache Reinigung des rekombinanten Proteins ohne Zellaufschluss, direkt aus dem Medium. Hierfür wurden die Zellkulturüberstände gesammelt und in einem „Batch-Verfahren“ mittels Metallchelatchromatographie mit der Nickelagarose für die Gewinnung des „AMI“-Proteins eingesetzt. Um die Reinheit des aufgereinigten Proteins zu ermitteln, wurden die gesammelten Proteinfractionen in einem 12% Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Hilfe der Coomassie-Blau-Färbung visualisiert (Abb. 16).

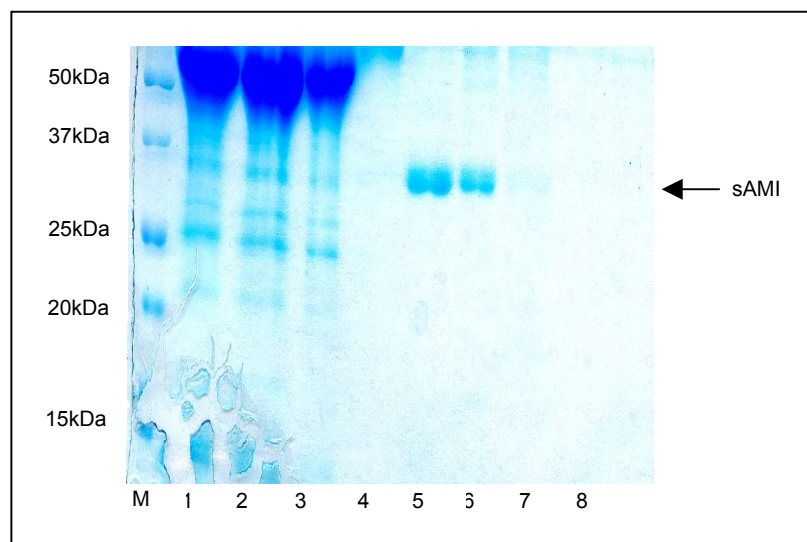


Abb.16 Coomassie-Blau-Färbung zur Detektion der Reinheit des über die Ni²⁺-NTA-Agarose gereinigten, löslichen „AMI“. 100 ml der Zellkulturüberstände wurden über Nacht bei 4 °C mit 500 µl der Agarose auf einem Überkopf-Schüttler inkubiert. Alle Reinigungs-Fractionen wurden gesammelt und nach der Proteinbestimmung (Bradford) auf ein 12% SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

Spur 1: Zellkulturüberstand (LD) 50 µg; Spur 2: Durchfluss-Fraktion (FT) 50 µg; Spur 3: Waschschrift 1 (W1) 50 µg; Spur 4: Waschschrift 2 (W2) 5 µg; Spur 5: Elutionsschrift 1 mit 50 mM Imidazol (E1) 3 µg; Spur 6: Elutionsschrift 2 mit 100 mM Imidazol (E2) 3 µg; Spur 7: Elutionsschrift 3 mit 150 mM Imidazol (E3) 3 µg; Spur 8: Elutionsschrift 4 mit 200 mM Imidazol (E4) 1,2 µg; M Dual Color Proteinmarker (Biorad).

Die auf der Höhe von ca. 37 kDa auftretende prominente Bande entspricht dem Molekulargewicht des löslichen „AMI“-Proteins. In den Schritten E1 (50 mM Imidazol) und E2 (100 mM Imidazol) wurde das meiste Protein mit hoher Reinheit eluiert. Mit

der Coomassie-Blau-Färbung konnten keine kontaminierenden Proteinbanden detektiert werden.

Die Funktionalität des gereinigten scFv „AMI“ in Bezug auf die Antigenbindung wurde mit Hilfe der Immunzytochemie in einer Fluoreszenz-Mikroskopie analysiert. Hierfür wurde eine Zelllinie, die nativ PSCA auf ihrer Oberfläche exprimiert, eingesetzt. Die HT1376-Zellen wurden auf Deckgläschen ausplattiert und mit dem scFv „AMI“ inkubiert. Nach der anschließenden Färbung mit dem anti-*c-myc* und Ziege-anti-Maus Antikörper wurden die gefärbten Zellen analysiert (Abb. 17). Ähnlich wie bei der immunzytochemischen Färbearanalyse mit den fixierten HT1376-Zellen und dem parentalen 7F5 Antikörper (siehe Abb. 10) wurde das PSCA hauptsächlich an der Zelloberfläche detektiert.

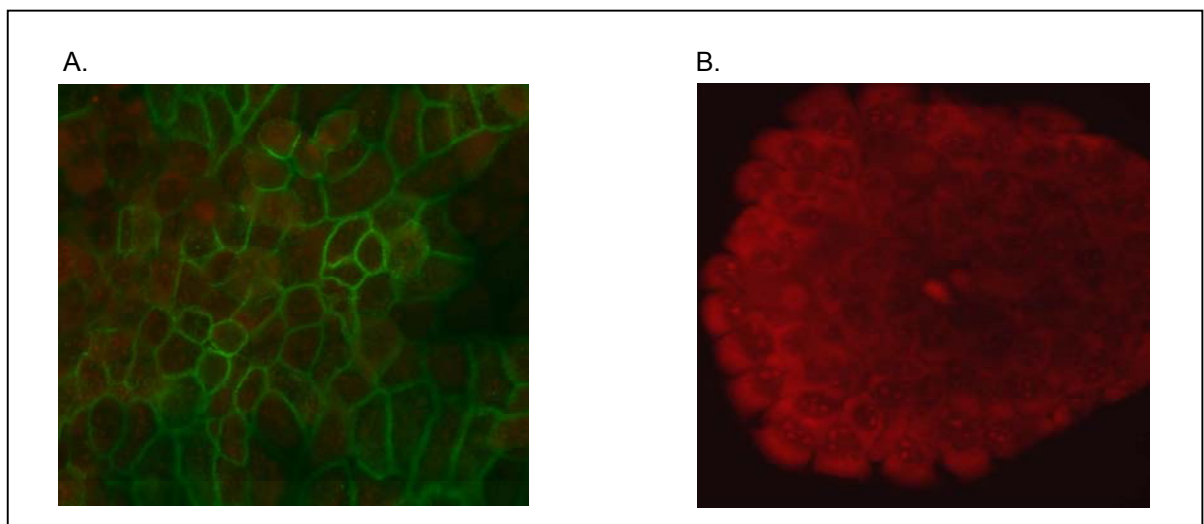


Abb.17 Immunzytochemischer Nachweis der Bindung des scFv „AMI“ an das auf der Zelloberfläche exprimierte PSCA. Die auf den Deckgläschen fixierten HT1376-Zellen wurden mit dem gereinigtem „AMI“ (10 µg/ml) und zur Visualisierung der Bindung mit anti-*c-myc* und Ziege-anti-Maus-FITC Ak (jeweils 10 µg/ml) inkubiert (**A.**). Als negative Kontrolle wurden die Zellen mit anti-*c-myc* und Ziege-anti-Maus-FITC Ak inkubiert. Für die Kerngegenfärbung wurde Propidiumiodid eingesetzt (**B.**).

Unter Einsatz der transfizierten HEK293-PSCA- bzw. HEK293-LV-Zellen wurde der Nachweis zur Bindung des „AMI“ auf nicht fixierten, nativen Zellen geliefert. Die Inkubation mit dem gereinigten „AMI“ und anschließend mit dem anti-*c-myc* und dem Ziege-anti-Maus-PE Antikörper resultierte in einer deutlichen Ringfluoreszenz auf der Oberfläche der in Suspension gefärbten PSCA-positiven Zellen (Abb. 18). Die mitgeführten Kontrollen blieben hingegen negativ.

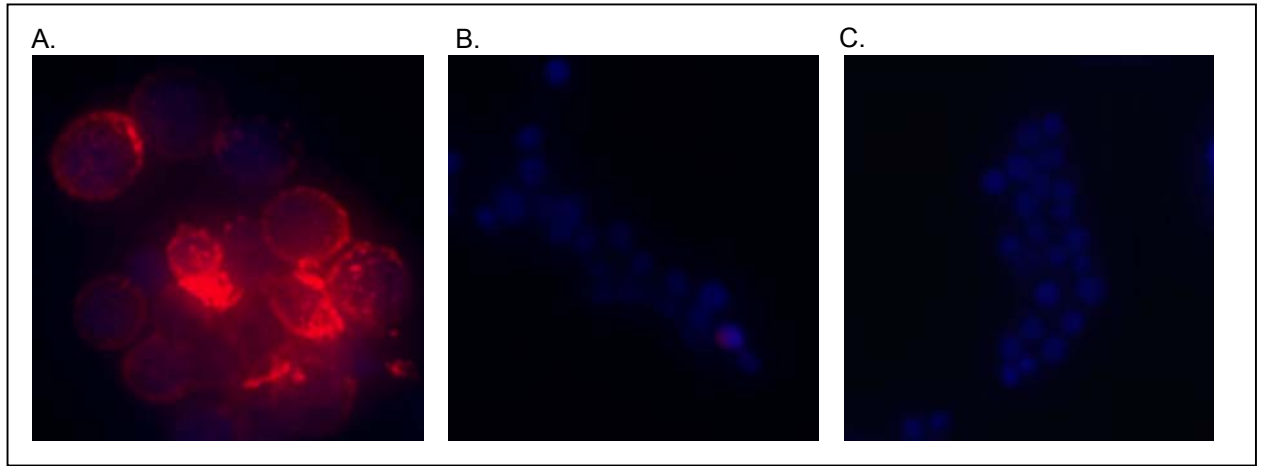


Abb.18 Native Färbung der HEK293-PSCA- und HEK293-LV-Zellen mit dem gereinigten löslichen scFv „AMI“. HEK293-PSCA-Zellen inkubiert mit „sAMI“, dem anti-*c-myc* Ak und dem Ziege-anti-Maus-PE Ak (je 10 µg/ml) (**A.**); HEK293-PSCA-Zellen inkubiert mit dem anti-*c-myc* Ak und dem Ziege-anti-Maus-PE Ak (je 10 µg/ml) (**B.**); HEK293-LV-Zellen inkubiert mit „sAMI“, anti-*c-myc* Ak und Ziege-anti-Maus-PE Ak (je 10 µg/ml) (**C.**). Die Kerngegenfärbung wurde mittels Hoechst 33342 durchgeführt.

Zur Bestätigung dieser immunzytochemischen Ergebnisse wurde eine durchflusszytometrische Bindungsanalyse mit dem gereinigten „sAMI“ unter Verwendung von den HEK293-PSCA- und HEK293-LV-Zellen durchgeführt (Abb. 19A.). Die Färbung der Zellen erfolgte nach gleichem Protokoll wie für die Immunfluoreszenzanalyse. Um die Bindungsstärke des generierten scFv mit der von dem parentalen 7F5 mAk direkt zu vergleichen, wurden die PSCA-positiven HEK293-Zellen mit je 10 µg/ml des „sAMI“ bzw. des 7F5 gefärbt (Abb. 19B.).

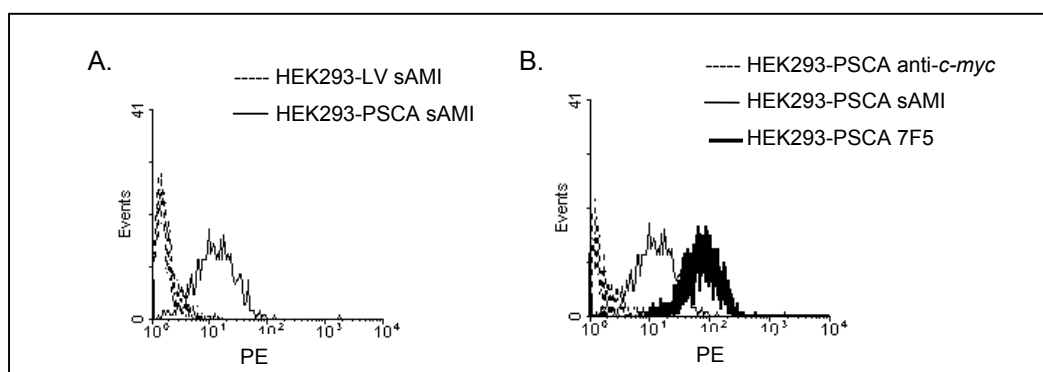


Abb.19 Durchflusszytometrische Bindungsanalyse des gereinigten „sAMI“ an das PSCA auf den transfizierten HEK293-Zellen. Die Bindungseigenschaften des gereinigten scFv wurden auf den HEK293-PSCA-Zellen (durchgehende schwarze Linie) und als negative Kontrolle auf den PSCA-negativen HEK293-LV-Zellen (gestrichelte Linie) untersucht (**A.**). Direkter Vergleich der

Bindungsstärke des „sAMI“ (durchgehende schwarze Linie) und des parentalen 7F5 mAk (kräftige schwarze Linie) an PSCA. Als negative Kontrolle wurden die PSCA-positiven Zellen mit dem anti-*c-myc* Ak und dem Ziege-anti-Maus-PE Ak gefärbt (gestrichelte Linie) (B.).

Die Ergebnisse der immunzytochemischen und der FACS-Analyse demonstrierten eine effiziente Bindung des generierten scFv „AMI“ an das Antigen sowohl auf den nativ PSCA-exprimierenden HT1376-Zellen als auch auf den mit PSCA transfizierten HEK293-Zellen. Die Bindungsstärke des löslichen Einzelkettenantikörpers war im Vergleich zu der des parentalen Antikörpers niedriger, was auf die monovalenten Bindungseigenschaften des generierten löslichen „AMI“-Proteins zurückzuführen ist.

3.3. Herstellung von löslichem PSCA (sPSCA)

3.3.1. Konstruktion eines eukaryotischen Vektors zur Herstellung von löslichem PSCA

Für die Bindungsanalysen mit dem Antigen an die chimären Rezeptoren wurde ein Vektor zur Herstellung von löslichem PSCA (sPSCA) konstruiert. Der pPSCA-IRES2-EGFP-Vektor diente dabei als Matrize zur Amplifikation der für PSCA kodierenden Sequenz. Durch die PCR-Reaktion wurden die Leader-Sequenz mit dem Start-Kodon und die GPI-Verankerungssequenz mit dem Stop-Kodon deletiert. Das isolierte DNA-Fragment wurde über die durch die PCR eingeführten *HindIII*- und *KpnI* Schnittstellen direkt in den pSecTag2B-Vektor einkloniert. Der so konstruierte pSecTag2B-sPSCA-Vektor enthielt zusätzlich eine murine Ig-kappa Leader-Sequenz, die für die Sekretion des Proteins ins Medium notwendig ist. Das C-terminal lokalisierte *c-myc*-Epitop und der His₆-Tag wurden zur Detektion der Antigenbindung bzw. für die Reinigung über Ni²⁺-NTA-Agarose eingesetzt. Der Aufbau des pSecTag2B-sPSCA-Vektors ist schematisch in der Abbildung 20 dargestellt.

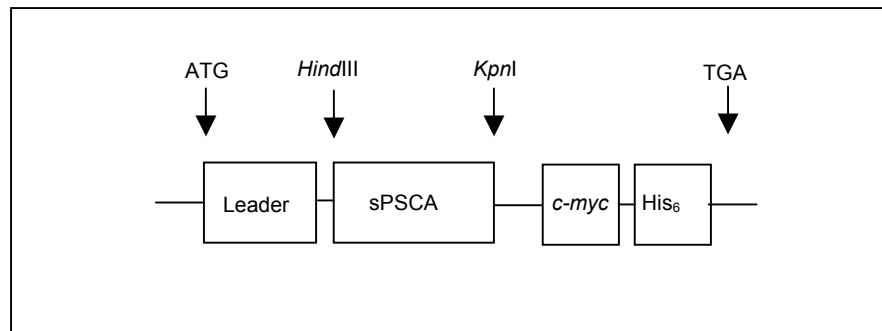


Abb.20 Schematische Darstellung des sPSCA-Konstruktes in dem pSecTag2B-Vektor. Die isolierte PSCA-Sequenz (ohne Leader- und GPI-Verankerungssequenz) wurde mittels *HindIII* und *KpnI* in den pSecTag2B Vektor einkloniert.

Abkürzungen: **ATG** Start-Kodon; **Leader** murine Ig-kappa Leader Sequenz; **sPSCA** lösliches PSCA; **c-myc** für ein *c-myc*-Epitop kodierende Sequenz; **His₆** aus sechs aufeinanderfolgenden Histidinen bestehender Tag; **TGA** Stop-Kodon.

3.3.2. Herstellung von rekombinantem PSCA in einem eukaryotischen System

Um das lösliche PSCA rekombinant herzustellen, wurden die HEK293-Zellen mit dem pSecTag2B-sPSCA-Vektor mittels Lipofectamine 2000 transfiziert. Die mit Zeocin (0,3 mg/ml) selektierten positiven Zellen wurden nach der Klonierung und Expandierung bezüglich der Sekretion vom sPSCA in den Zellkulturüberstand in einer Western Blot-Analyse untersucht. Hierfür wurden die gesammelten Überstände direkt auf das 12% SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und anschließend mit dem anti-*c-myc*, anti Penta-His und dem anti-PSCA 7F5 mAk entwickelt. Als negative Kontrolle wurden die Überstände von HEK293 LV-Zellen mitgeführt (Abb. 21). Das von den transfizierten HEK293-Zellen sekretierte lösliche PSCA konnte mit den anti-*c-myc*- und anti-Penta-His- Antikörpern detektiert werden. Die innerhalb vom PSCA vorhandenen, multiplen N-Glykosylierungsstellen resultieren in einer Generierung von Proteinen mit unterschiedlichem Molekulargewicht (MW) von ca. 20 kDa bis ca. 30 kDa. Das am C-Terminus angebrachte *c-myc*-Epitop und der His₆-Tag führen zur Erhöhung des Molekulargewichtes um ca. 5-7 kDa. Im Gegensatz dazu konnte mit dem 7F5 Ak kein lösliches PSCA nachgewiesen werden. Eine mögliche Ursache dafür ist die Auflösung der intramolekularen Disulfid-Brücken des Proteins durch Zugabe des 2-Mercaptoethanol-enthaltenden Probenpuffers.

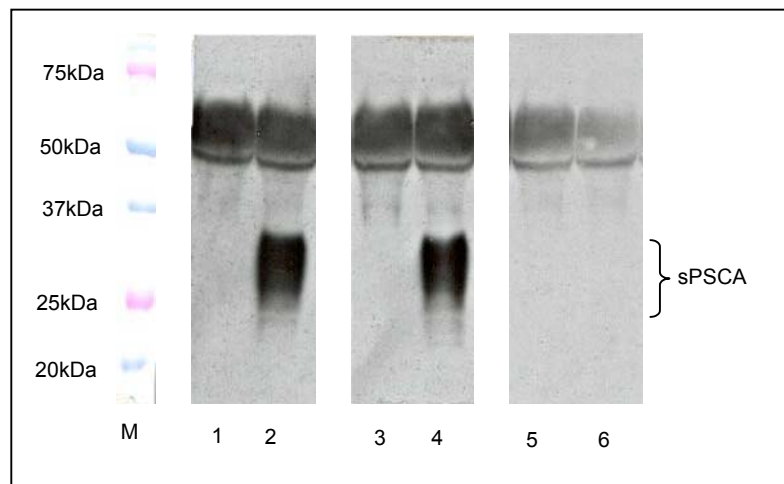


Abb.21 SDS-PAGE mit Zellüberständen von pSecTag2B-sPSCA bzw. pSecTag2B LV transfizierten Zellen. Auftrennung von je 20 µl Zellüberstand auf einem 12% Polyacrylamidgel unter reduzierenden Bedingungen, anschließend Detektion mit dem anti-*c-myc* (200 ng/ml), anti-Penta-His (100 ng/ml) bzw. anti-PSCA 7F5 (2 µg/ml) Antikörper und mit dem HRP-markierten Kaninchen-anti-Maus Antikörper (1 µg/ml).

Spur 1: HEK293-LV mit anti-Penta-His Ak; Spur 2: HEK293-sPSCA mit anti-Penta-His Ak; Spur 3: HEK293-LV mit anti-*c-myc* Ak; Spur 4: HEK293-sPSCA mit anti-*c-myc* Ak; Spur 5: HEK293-LV mit anti-PSCA 7F5 Ak; Spur 6: HEK293-sPSCA mit anti-PSCA 7F5 Ak; M Dual Color Proteinmarker (Biorad).

Durch die Aufnahme der Zellkulturüberstände in einen nicht reduzierenden Probenpuffer (ohne 2-Mercaptoethanol) und Entwicklung des Western Blots mit dem 7F5 Ak konnte das lösliche PSCA detektiert werden (Abb. 22).

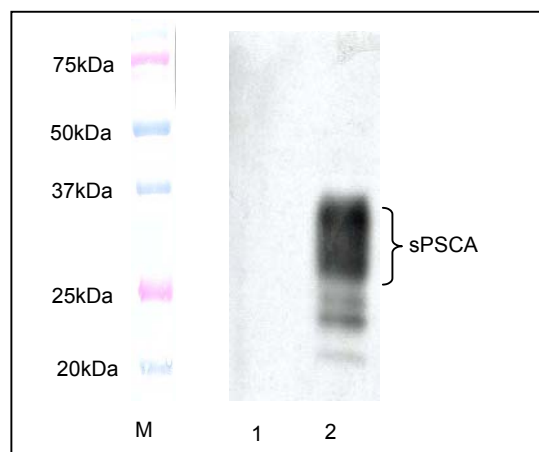


Abb.22 SDS-PAGE mit Zellüberständen von pSecTag2B-sPSCA bzw. pSecTag2B (LV) transfizierten Zellen. Auftrennung von je 20 µl Zellüberstand auf einem 12% Polyacrylamidgel unter nicht reduzierenden Bedingungen, anschließend Detektion mit dem anti-PSCA 7F5 (2 µg/ml) Ak und dem HRP-markierten Kaninchen-anti-Maus Ak (1 µg/ml). Spur 1: HEK293-LV; Spur 2: HEK293-sPSCA; M Dual Color Proteinmarker (Biorad).

Die zwischen 20 kDa und 24 kDa auftretenden zusätzlichen Banden sind vermutlich auf durch Proteaseaktivität entstandene Abbauprodukte zurückzuführen, da keine Proteaseinhibitoren zu dem Zellkulturüberstand gegeben wurden.

Nachdem das sezernierte Protein mit Hilfe des 7F5 Ak eindeutig als PSCA detektiert wurde, wurde der angehängte His₆-Tag zur Reinigung des Proteins über die Metallchelatchromatographie direkt aus dem Zellkulturüberstand in einem „Batch-Verfahren“ eingesetzt. Die Reinheit der eluierten Proteinfractionen wurde in einem 8% SDS-Polyacrylamidgel und anschließender Coomassie-Blau-Färbung ermittelt (Abb. 23).

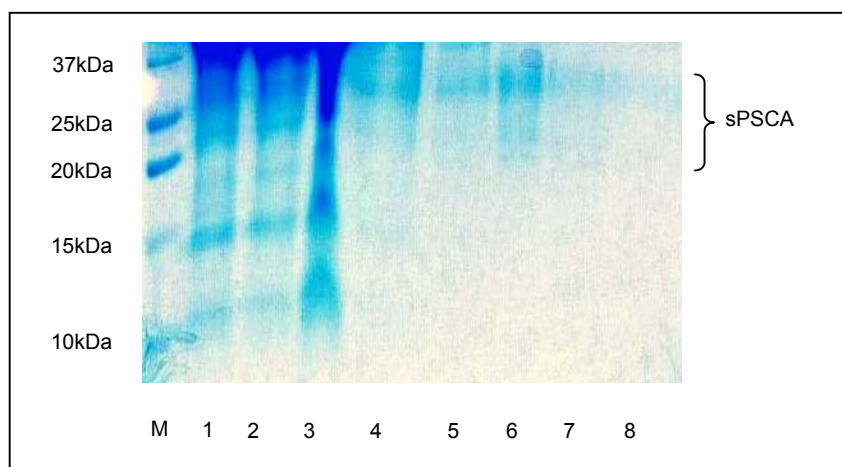


Abb.23 Coomassie-Blau Färbung zur Detektion der Reinheit des über Ni²⁺-NTA-Agarose gereinigten, löslichen „AMI“. 100 ml der Zellkulturüberstände wurden über Nacht bei 4 °C mit 500 µl der Agarose auf einem Überkopf-Schüttler inkubiert. Alle Reinigungsfraktionen wurden gesammelt und nach der Proteinbestimmung (Bradford) auf ein 8% SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

Spur 1: Zellkulturüberstand (LD) 50 µg; Spur 2: Durchfluss-Fraktion (FT) 50 µg; Spur 3: Waschschritt 1 (W1) 50 µg; Spur 4 Elutionsschritt 1 mit 50 mM Imidazol (E1) 5 µg; Spur 5: Elutionsschritt 2 mit 100 mM Imidazol (E2) 5 µg Spur 6: Elutionsschritt 3 mit 150 mM Imidazol (E3) 5 µg; Spur 7: Elutionsschritt 4 mit 200 mM Imidazol (E4) 5 µg; Spur 8: Elutionsschritt 5 mit 250 mM Imidazol (E5) 5 µg; M Dual Color Proteinmarker (Biorad).

Ähnlich wie in der Western Blot-Analyse erschien das lösliche PSCA aufgrund der multiplen Glykosylierungen in Form von mehreren Banden. Das meiste Protein wurde durch die Elution mit dem 150 mM Imidazol gewonnen. Die Funktionalität des gereinigten löslichen PSCA wurde in Bindungsassays unter Beteiligung der mit den chimären Rezeptoren modifizierten Zellen untersucht.

3.4. Generierung von chimären Rezeptoren

3.4.1. Konstruktion eines chimären T-Zell-Beta-Rezeptors

3.4.1.1. Der chimäre AMI-BetaC2-Rezeptor

Für die Generierung eines chimären Beta-Rezeptors wurde im ersten Schritt die gesamte konstante BetaC2 Domäne eines humanen T-Zell-Rezeptors mittels spezifischer Primer amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in den pCR3.1-Vektor subkloniert und sequenziert. Das isolierte DNA-Fragment enthielt die kodierende Region für den extrazellulären, Transmembran- und intrazellulären Bereich der BetaC2-Kette und *Clal* und *HpaI* Schnittstellen am 5'- bzw. 3'-Ende. Parallel wurde das „AMI“-Konstrukt mit Hilfe des T7 Vorwärtsprimers und des „AMI“ f.BetaC2 Rückwärtsprimers für eine direkte Fusion mit der BetaC2-Kette amplifiziert. Durch die PCR-Reaktion wurden das *c-myc*-Epitop mit dem His₆-Tag und dem Stop-Kodon deletiert und am 3'-Ende eine *Clal*-Schnittstelle zugefügt. Der verkürzte Einzelkettenantikörper „AMI“ wurde über die *EcoRV* und *Clal* Schnittstellen in den retroviralen pcz-CFG5.1-MCS-Vektor umklontiert. Die Fusion im Leserahmen des „AMI“ mit der BetaC2-Kette erfolgte über die *Clal* und *HpaI* Schnittstellen. Das gesamte AMI-BetaC2-Konstrukt ist in der Abbildung 24 schematisch dargestellt.

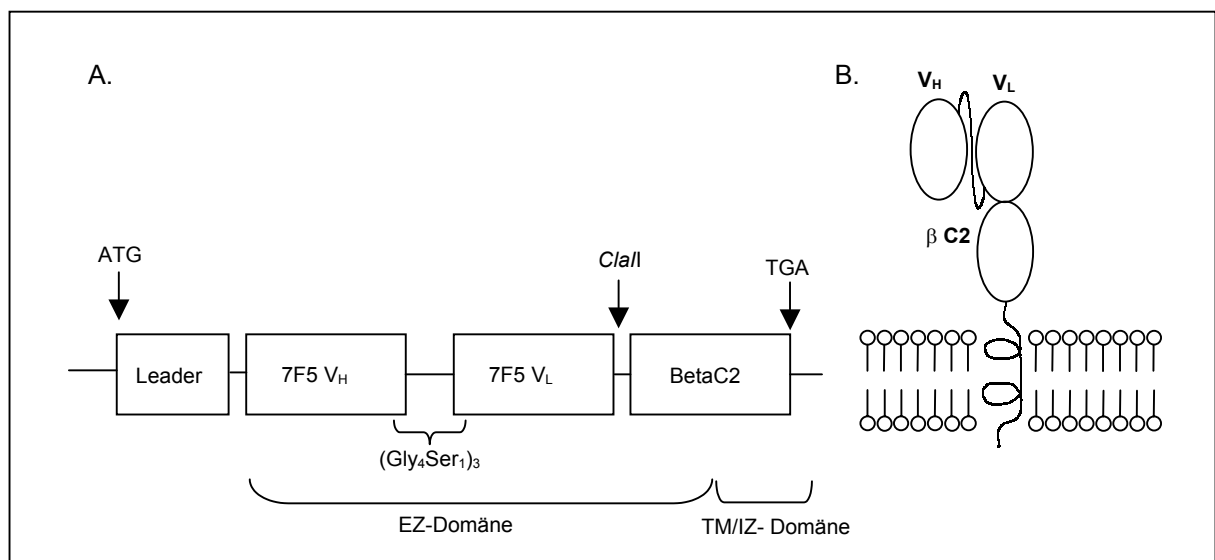


Abb.24 (A.) Schematische Darstellung des chimären AMI-BetaC2-Konstrukts in dem retroviralen pcz-CFG5.1-MCS-Vektor. Mittels PCR wurde der Einzelkettenantikörper „AMI“ verkürzt (Deletion des *c-myc*-Epitops mit dem His₆-Tag und dem Stop-Kodon) und in den retroviralen pcz-

CFG5.1-MCS-Vektor umklont. Die Fusion des „AMI“ mit der BetaC2-Kette wurde unter Einsatz von *Cla*I und *Hpa*I Restriktionsenzymen durchgeführt. Die extrazellulären (EZ), Transmembran- (TM) und intrazellulären (IC) Domänen des AMI-BetaC2-Rezeptors wurden gekennzeichnet.

(B.) Schematische Darstellung des AMI-BetaC2-Konstruktes als Zelloberflächen-exprimierter Rezeptor. Der extrazelluläre Teil des Rezeptors besteht aus dem Einzelkettenantikörper „AMI“ (V_H -Linker- V_L) und der konstanten BetaC2-Kette (β C2). Die Transmembran- und intrazelluläre Domänen wurden ebenfalls von der konstanten BetaC2-Kette (β C2) abgeleitet.

Die Expression des chimären AMI-BetaC2-Proteins wurde zuerst in den HEK293-Zellen untersucht. Hierfür wurden die Zellen mit dem pcz-CFG5.1-AMI-BetaC2 Vektor mittels Lipofectamine 2000 transfiziert. Die positiven Zellen wurden unter Einsatz von Zeocin (0,3 mg/ml) selektioniert und kloniert. Die Expressionsanalyse wurde mit Hilfe des monoklonalen anti-Human TCR-BetaC-Kette Antikörpers (β F1, Endogen) durchgeführt, zur Detektion der Bindung wurde der Ziege-F(ab)₂-anti-Maus Ig-FITC Ak verwendet. Als negative Kontrolle wurden die HEK293-LV-Zellen mitgeführt. Mittels der nativen Oberflächenfärbung der AMI-BetaC2 transfizierten HEK293-Zellen wurde wie erwartet kein chimärer Rezeptor nachgewiesen (Abb. 25 A.). Die Gründe für die ausbleibende Oberflächenexpression des chimären Rezeptors AMI-BetaC2 sind die natürlichen Eigenschaften der nativen Beta-Kette des T-Zell-Rezeptors. Die Beta-Kette wird bekannterweise als eine Komponente des CD3-TCR-Komplexes auf der Oberfläche exprimiert. Ohne die restlichen Assoziationspartner wird die Kette in der Zelle akkumuliert und proteolytisch abgebaut. Aufgrund der fehlenden Expression an der Alpha-Kette des TCR und den Molekülen des CD3-Komplexes in den HEK293-Zellen konnte der chimäre Rezeptor ausschließlich intrazytoplasmatisch nachgewiesen werden. Die durchgeführten durchflusszytometrischen (Abb. 25B. und C.) und immunzytochemischen Analysen am konfokalen Laserscanning-Mikroskop (Abb. 26) mit fixierten und permeabilisierten Zellen wurde die intrazytoplasmatische Akkumulation des chimären Rezeptors nachgewiesen.

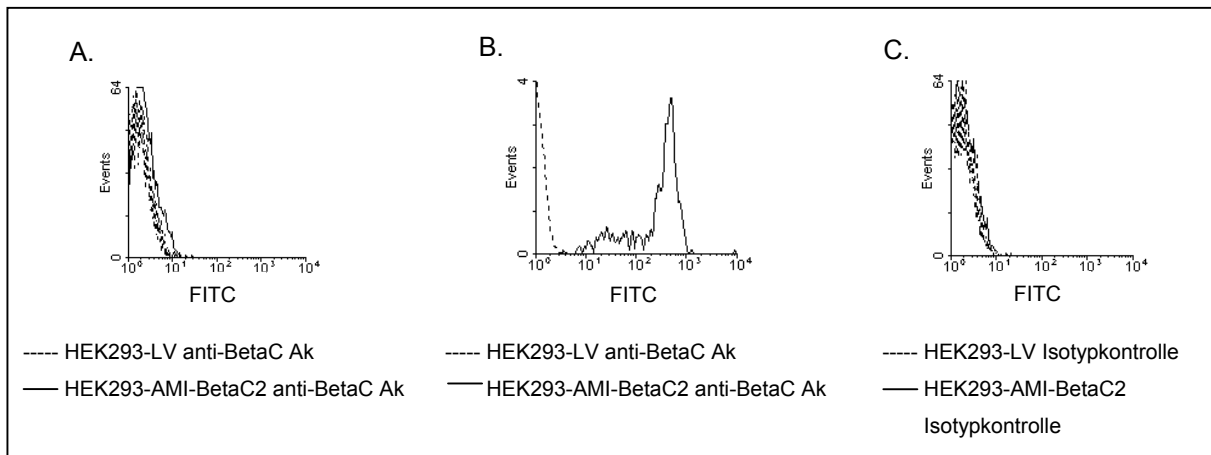


Abb.25 Native Oberflächenfärbung der HEK293-LV- und AMI-BetaC2-Zellen mit dem anti-BetaC Ak (10 µg/ml) und mit dem Ziege-F(ab)₂-anti-Maus Ig-FITC Ak (10 µg/ml). Die AMI-BetaC2-Zellen sind mit durchgehender schwarzer Linie und die LV-Zellen mit gestrichelter Linie eingezeichnet (**A.**). Intrazelluläre Färbung der HEK293-LV und AMI-BetaC2-Zellen mit dem anti-BetaC Ak (10 µg/ml) und mit dem Ziege-F(ab)₂-anti-Maus Ig-FITC Ak (10 µg/ml). Die AMI-BetaC2 transfizierten Zellen sind mit durchgehender schwarzer Linie und die LV transfizierten Zellen mit gestrichelter Linie eingezeichnet (**B.**). Eine Isotypkontrolle wurde mitgeführt (**C.**).

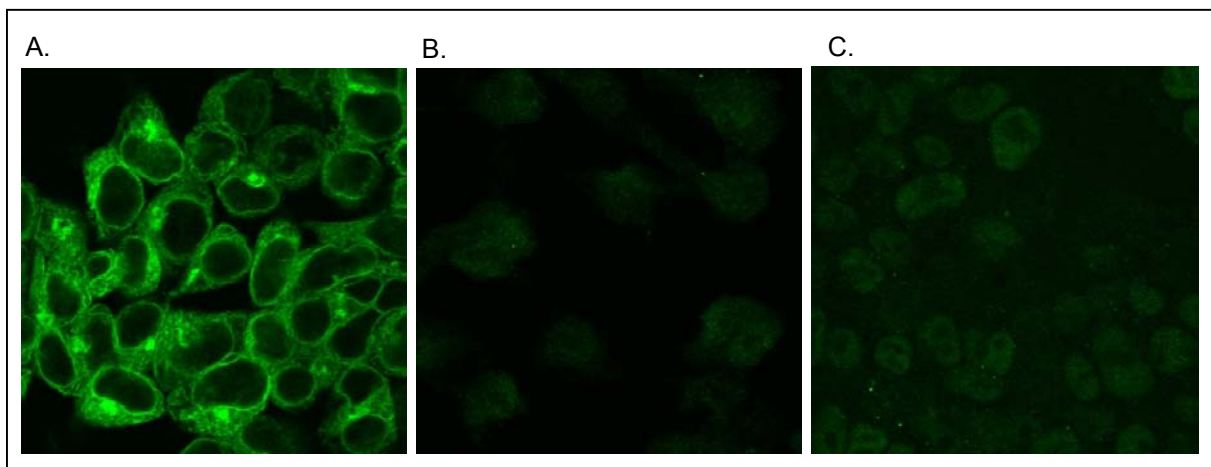


Abb.26 Intrazelluläre AMI-BetaC2-Proteinexpressionsanalyse in den HEK293-LV- und AMI-BetaC2-Zellen wurde mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie durchgeführt. Die mit 4% PFA auf den Deckgläschen fixierten und permeabilisierten HEK293-AMI-BetaC2-Zellen (**A.**) bzw. die HEK293-LV-Zellen (**B.**) wurden mit dem anti-BetaC-Ak (10 µg/ml) und dem Ziege-F(ab)₂-anti-Maus Ig-FITC Ak (10 µg/ml) gefärbt. Die Isotypkontrolle mit den HEK293-AMI-BetaC2-Zellen wurde mitgeführt (**C.**).

Um die Assoziation der chimären Beta-Kette mit der Alpha-Kette und dem CD3-Komplex zu gewährleisten, wurden retrovirale Partikel für die Transduktion der humanen T-Zelllinien J.RT3-T3.5 und Jurkat mit dem Drei-Vektor-System (pHIT60,

pVSV-Gwt und der retrovirale Vektor) generiert. Um die Ermittlung der Transduktionsrate einfacher zu gestalten, wurde der retrovirale pcz-CFG5.1-AMI-BetaC2-Vektor mit dem Reportergen-Konstrukt IRES2-EGFP modifiziert. Die Transduktionsrate wurde mit Hilfe der durchflusszytometrischen Analyse anhand der Koexpression vom EGFP ermittelt (Abb. 27). Der dabei ermittelte MFI-Wert lag für beide transduzierten Zelllinien im Bereich von 10^2 .

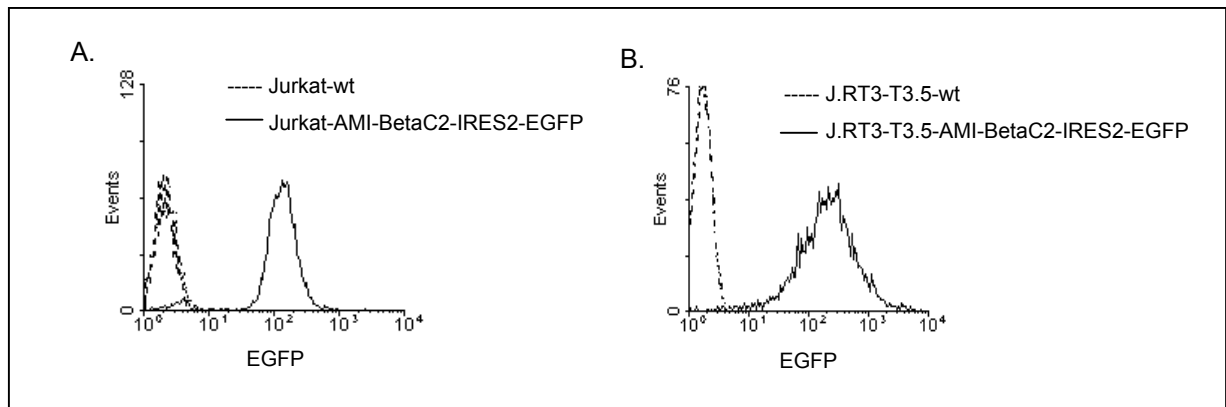


Abb.27 Durchflusszytometrische Analyse der Transduktionsrate in den Jurkat-AMI-BetaC2-IRES2-EGFP-Zellen (A.) und in den J.RT3-T3.5-AMI-BetaC2-IRES2-EGFP-Zellen (B.). Die durchgehende schwarze Linie repräsentiert die transduzierten Zellen und die gestrichelter Linie die wt-Zellen.

Die erfolgreich transduzierten Zellen wurden für die Oberflächenexpressionsanalyse des chimären Rezeptors herangezogen. Die J.RT3-T3.5-Zellen wurden von der Jurkat-T-Zelllinie abgeleitet und exprimieren aufgrund der Abwesenheit der Beta-Kette keinen TCR auf ihrer Oberfläche. Es wurde spekuliert, dass durch die Transduktion der Zellen mit der chimären Beta-Kette die Expression des TCR-CD3-Komplexes möglicherweise wiederhergestellt werden könnte. Um dies zu untersuchen, wurden die transduzierten J.RT3-T3.5-Zellen mit dem anti-CD3 Ak und dem anti-BetaC Ak nativ gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 28A., B.). Trotz einer Transduktionsrate von über 90% konnte keine CD3- und nur eine schwache Beta-Ketten-Oberflächenexpression nachgewiesen werden. Außerdem wurde die Oberflächenexpression der endogenen Alpha-Kette als direkter Assoziationspartner der Beta-Kette mitanalysiert. Mittels der nativen Färbung mit dem monoklonalen anti-Human TCR-AlphaC-Kette Antikörper (α F1, Endogen) konnte ebenfalls keine Oberflächenexpression nachgewiesen werden (Abb. 28 C.).

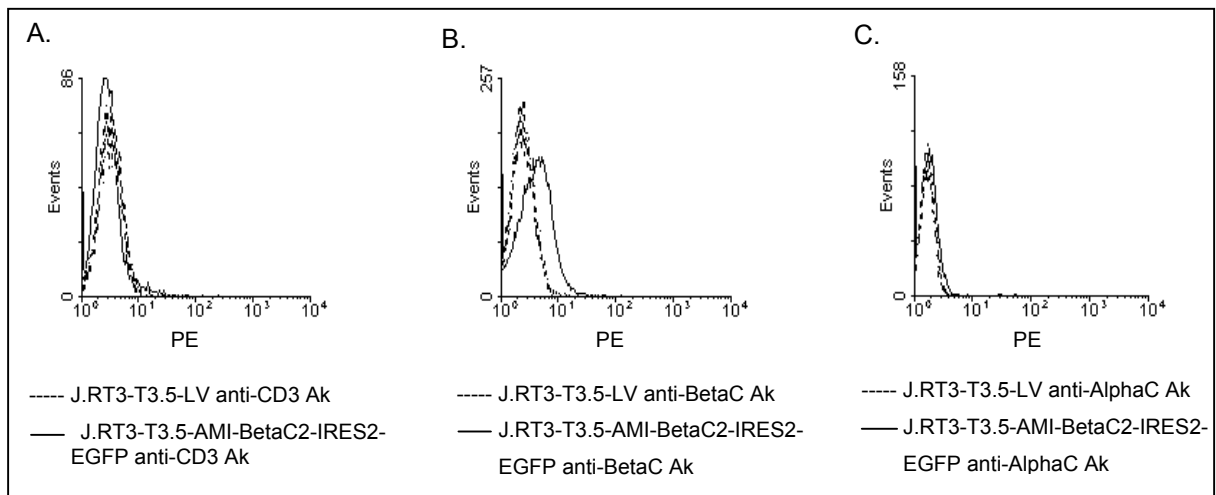


Abb.28 Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression des CD3-Komplexes mit der chimären Beta-Kette und der endogenen Alpha-Kette auf den transduzierten J.RT3-T3.5-Zellen. Native Expressionsanalyse des CD3-Moleküls mit Hilfe des direkt PE-markierten anti-CD3 Ak (unverdünnt) (**A.**), der chimären Beta-Kette mit Hilfe des anti-BetaC Ak (10 µg/ml) und des Ziege-F(ab)₂-anti-Maus Ig-PE Ak (10 µg/ml) (**B.**) und der endogenen Alpha-Kette mittels des anti-AlphaC Kette Ak (10 µg/ml) und des Ziege-F(ab)₂-anti-Maus Ig-PE Ak (10 µg/ml) (**C.**). Die durchgehende schwarze Linie repräsentiert die mit pcz-CFG 5.1-AMI-BetaC2-IRES2-EGFP transduzierten Zellen und die gestrichelte Linie die mit pcz-CFG 5.1-IRES2-EGFP (LV) transduzierten Zellen.

Eine mögliche Ursache für die schwache Oberflächenexpression der chimären Beta-Kette ist die mangelhafte Expression der natürlichen Assoziationspartner wie der Alpha-Kette und des CD3-Komplexes in den modifizierten Zellen. Um dies zu untersuchen wurden die transduzierten J.RT3-T3.5-Zellen permeabilisiert und intrazellulär mit dem anti-BetaC Ak, dem anti-AlphaC Ak und dem anti-CD3 Ak gefärbt (Abb. 29).

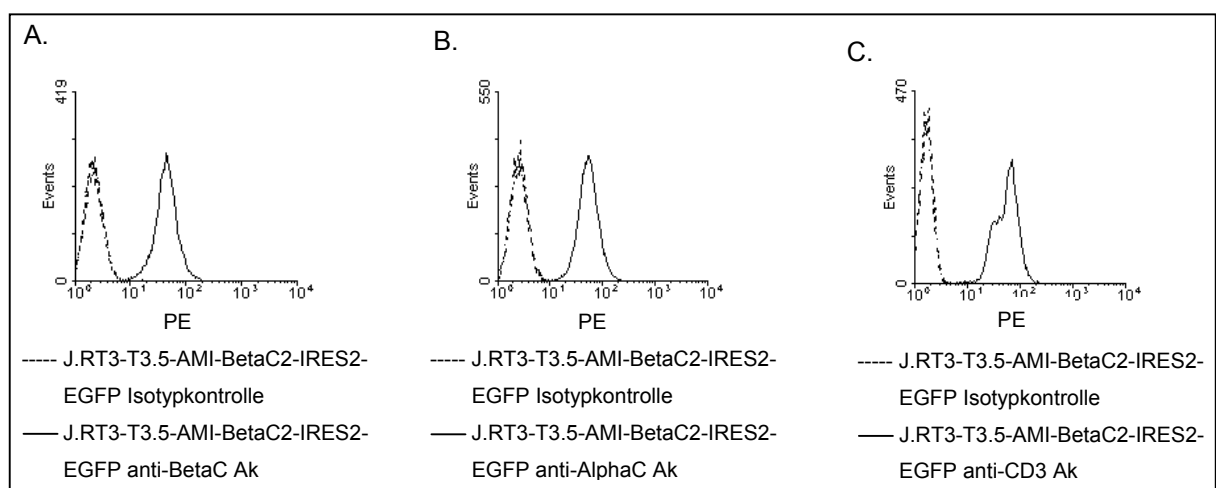


Abb.29 Durchflusszytometrische Analyse der intrazellulären Expression der chimären Beta-Kette mit dem anti-BetaC Ak (10 µg/ml) und dem Ziege-F(ab)₂-anti-Maus Ig-PE Ak (10 µg/ml) (**A.**), der endogenen Alpha-Kette mit dem anti-AlphaC Kette (10 µg/ml) und dem Ziege-F(ab)₂-anti-Maus Ig-PE Ak (10 µg/ml) (**B.**) und des CD3-Komplexes mit dem anti-CD3 PE Ak (unverdünnt) (**C.**). Die jeweiligen Färbungen der J.RT3-T3.5-AMI-BetaC2-IRES2-EGFP-Zellen wurden mit durchgehender schwarzer Linie und die Isotypkontrollen mit gestrichelter Linie dargestellt.

Anhand der intrazellulären Expressionsanalyse konnte die unzureichende Expression der endogenen Alpha-Kette und des CD3-Komplexes als mögliche Ursache der schwachen Oberflächenexpression der chimären Kette ausgeschlossen werden. Durch die Transduktion der CD3⁺-Jurkat Zelllinie mit dem AMI-BetaC2-IRES2-EGFP-Konstrukt sollten Gründe für die intrazelluläre Akkumulation der chimären Beta-Kette, die auf die Mutation in den J.RT3.T3.5-Zellen zurückzuführen wären, ausgeschlossen werden. Da die Jurkat-Zellen auf ihrer Oberfläche den CD3-Komplex mit den endogenen Alpha- und Beta-Ketten als TCR exprimieren, wurde für die Expressionsanalyse der chimären Beta-Kette ein anti-scFv Ak (Ziege-anti-Maus F(ab)₂-Cy3, Dianova) herangezogen (Abb. 30). Dieser Antikörper bindet im 5'-Bereich der konstanten C_{H1}- und C_L-Domänen, die mittels der Isotyp-spezifischen IgG1-V_H rev und IgG1-V_L rev Primern an die variablen Ketten des „AMI“-Konstruktes zugefügt wurden.

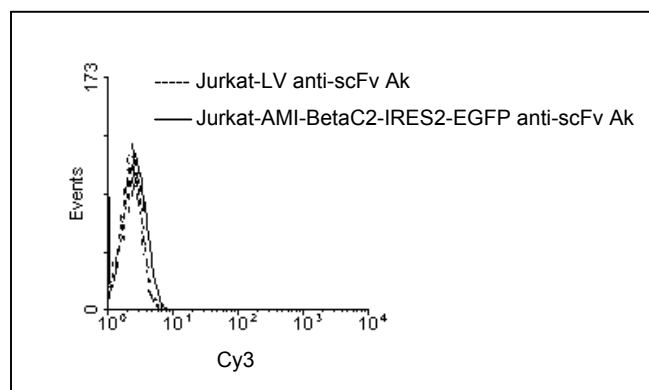


Abb.30 Durchflusszytometrische Analyse der Expression der chimären AMI-BetaC2-Kette auf der Oberfläche von transduzierten Jurkat-Zellen. Die native Färbung der Jurkat-AMI-BetaC2-IRES2-EGFP-Zellen mit dem anti-scFv Ak (Ziege-anti-Maus F(ab)₂-Cy3, 10 µg/ml) ist durch die durchgehende schwarze Linie und die Färbung der Jurkat-LV-Zellen mit dem gleichen Antikörper ist durch die gestrichelte Linie wiedergegeben.

Obwohl über 95% der Jurkat-Zellen transduziert wurden (Abb. 27A.) konnte keine chimäre Beta-Kette auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden.

3.4.1.2. Der chimäre AMI-BetaC-CD3 Zeta-Rezeptor

Da die Expression des chimären AMI-BetaC2-Rezeptors in Assoziation mit der endogenen Alpha-Kette und dem CD3-Komplex auf der Zelloberfläche nicht erreicht werden konnte, wurde ein neues chimäres Konstrukt bestehend aus der Transmembrandomäne und den intrazellulären Domänen der Zeta (ζ)-Kette des humanen TCR generiert. Hierfür wurden die Transmembrandomäne und die intrazellulären Domänen der BetaC-Kette mit Hilfe von spezifischen Primern und dem pcz-CFG5.1-AMI-BetaC2-Vektor als Matrize deletiert. Das PCR-Produkt wurde in den pCR2.1-Vektor kloniert. Die amplifizierte DNA enthielt die kodierende Sequenz für den extrazellulären Teil der konstanten BetaC2-Kette mit einer zusätzlichen *EcoRV* Schnittstelle für eine direkte Fusion mit der ζ -Kette. Die Transmembrandomäne und intrazellulären Domänen der humanen CD3 ζ -Kette wurden mittels spezifischer Primer aus der cDNA von humanen T-Zellen isoliert. Das PCR-Produkt wurde in den pCR2.1-Vektor kloniert. Nach der Fusion der AMI-BetaC und der ζ -Kette über die *EcoRV*-Schnittstelle und anschließender Sequenzierung erfolgte eine Umklonierung des gesamten Konstruktes in den retroviralen pcz-CFG5.1-MCS-Vektor. Das gesamte AMI-BetaC-CD3 Zeta-Konstrukt ist schematisch in der Abbildung 31 dargestellt.

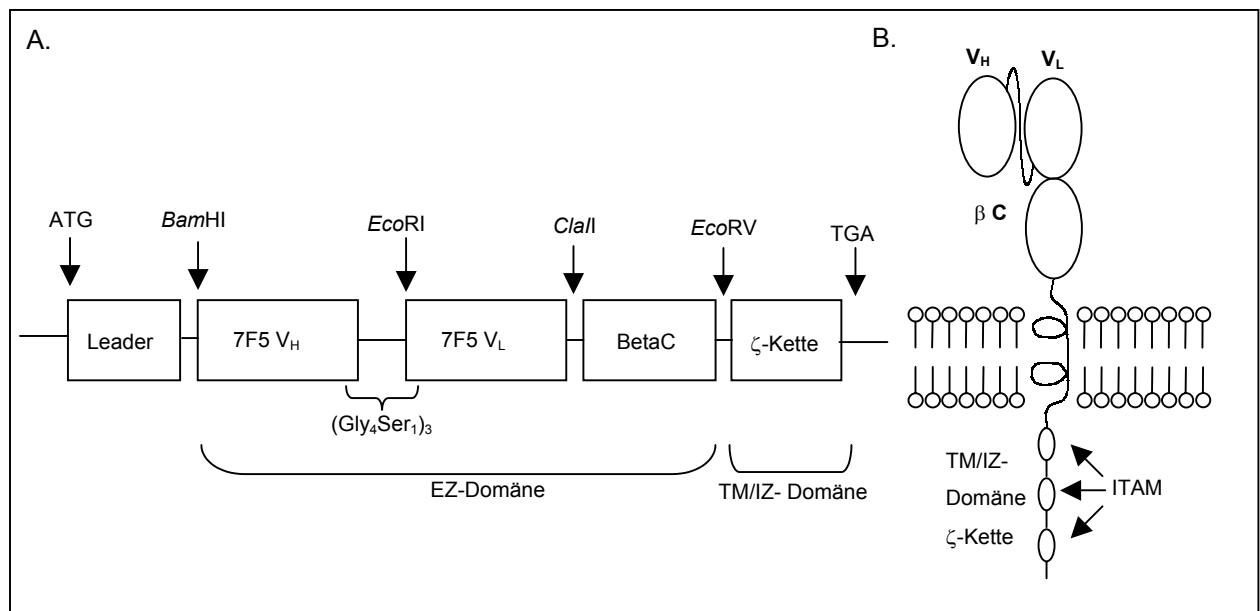


Abb.31 (A.) Schematische Darstellung des chimären AMI-BetaC-CD3 Zeta-Konstruktes im retroviralen Vektor pcz-CFG5.1-MCS. Die Leserahmen-erhaltende-Fusion des AMI-BetaC mit der Zeta-Kette wurde unter Einsatz des Restriktionsenzym *EcoRV* durchgeführt. Die

extrazelluläre- (EZ), Transmembran- (TM) und die intrazelluläre- (IC) Domänen des AMI-BetaC-CD3 Zeta-Rezeptors wurden gekennzeichnet.

(B.) Schematische Darstellung des AMI-BetaC-CD3 Zeta-Konstruktes als Zelloberflächen-exprimierter Rezeptor. Der extrazelluläre Teil des Rezeptors besteht aus dem Einzelkettenantikörper „AMI“ (V_H -Linker- V_L) und der extrazellulären Domäne der Beta-Kette (βC). Die Transmembrandomäne und die intrazellulären Domänen werden von der Zeta-Kette (ζ) des humanen CD3-Komplexes gebildet. In dem intrazellulären Bereich sind die ITAM- (immunoreceptor tyrosine-based activation motif)-Sequenzen gekennzeichnet.

Um die Oberflächenexpression der chimären AMI-BetaC-CD3 ζ -Kette zu untersuchen, wurden die CD3⁻ HEK293-Zellen mit dem Vektor transfiziert, einer nativen Färbung mit dem anti-BetaC Ak unterzogen, und anschließend durchflusszytometrisch und mikroskopisch analysiert (Abb. 32). Der Austausch der Transmembrandomäne und der intrazellulären Domänen des AMI-BetaC2-Rezeptors gegen die der ζ -Kette führte zu einer TCR-CD3-unabhängigen Expression des chimären Rezeptors auf der Zelloberfläche. Die Oberflächenexpression vom AMI-BetaC-CD3 ζ -Rezeptor wurde in Form einer Ringfluoreszenz detektiert. Die mitgeführte Kontrolle mit den HEK293-LV-Zellen blieb hingegen negativ.

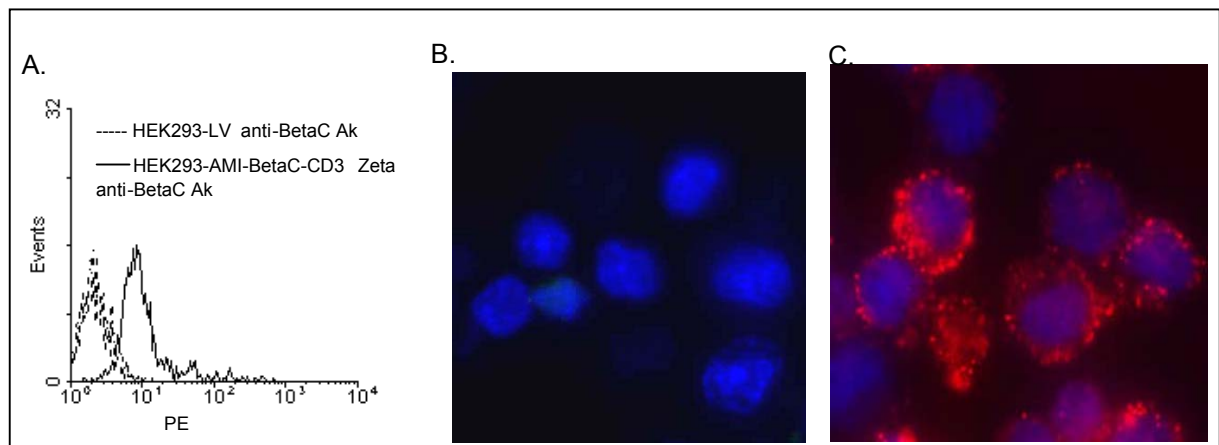


Abb.32 Native Oberflächenexpressionsanalyse der chimären AMI-BetaC-CD3 Zeta-Kette auf den transfizierten HEK293-Zellen. Durchflusszytometrische Analyse unter Verwendung des anti-BetaC Ak (10 μ g/ml) und des Ziege-F(ab)₂-anti Maus Ig-PE Ak (10 μ g/ml). Die AMI-BetaC-CD3 Zeta-Zellen sind mit durchgehender schwarzer Linie und die LV-Zellen mit gestrichelter Linie eingezeichnet **(A.)**. Native immunzytochemische Analyse der chimären HEK293-LV-Zellen **(B.)** und der HEK293-AMI-BetaC-CD3 Zeta-Zellen **(C.)**. Die Kerngegenfärbung wurde mittels Hoechst 33342 durchgeführt.

Der generierte AMI-BetaC-CD3 Zeta-Rezeptor wurde anschließend in der CD3⁺ T-Zelllinie Jurkat hinsichtlich seiner Oberflächenexpression und Antigenerkennung analysiert. Hierfür wurden die Jurkat-Zellen mit dem retroviralen Vektor pcz-CFG5.1-AMI-BetaC-CD3 Zeta transduziert, einer nativen Färbung mit dem anti-scFv Ak und mit sPSCA unterzogen. Mittels einer durchflusszytometrischen Analyse wurde eine starke Oberflächenexpression des chimären Rezeptors detektiert (Abb. 33A.). Die im Vergleich zum parentalen 7F5 Antikörper verringerte Bindungsintensität des Einzelkettenantikörpers AMI ist stark genug um lösliches PSCA effizient zu binden (Abb.33B.).

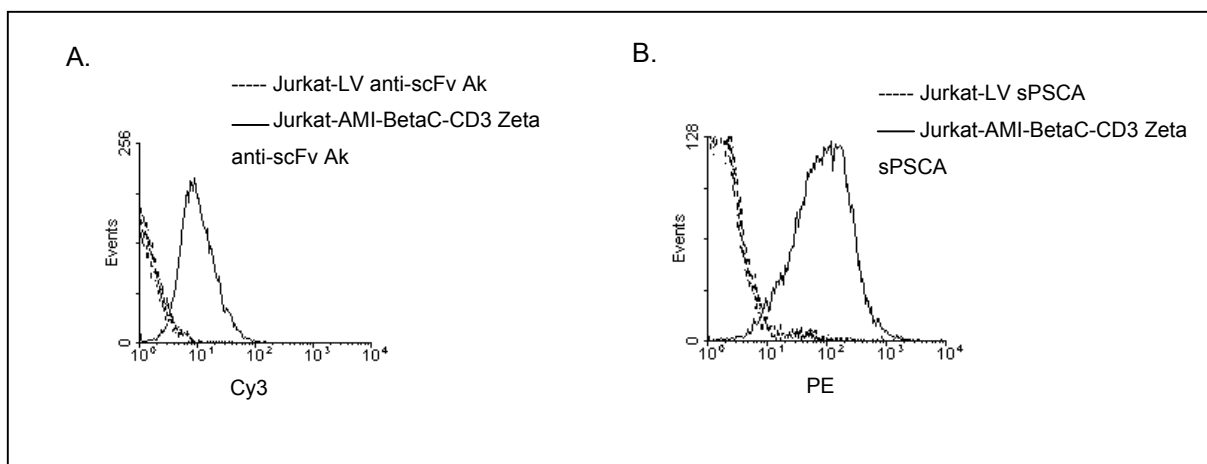


Abb.33 Native Oberflächenfärbung der Jurkat-LV-Zellen und AMI-BetaC-CD3 Zeta-Zellen mit dem anti-scFv-Cy3 mAk (10 µg/ml). Die AMI-BetaC-CD3 Zeta-Zellen sind mit durchgehender schwarzer Linie und die LV-Zellen mit gestrichelter Linie eingezeichnet **(A.)**. Durchflusszytometrische Analyse der Bindung des löslichen PSCA (sPSCA) an den chimären AMI-BetaC-CD3 Zeta-Rezeptor auf den HEK293-Zellen. Die Bindung des sPSCA (10 µg/ml vom Elutionsschritt 3) wurde über den anti-*c-myc* Ak (10 µg/ml) und den Ziege-F(ab)₂-anti Maus Ig-PE Ak (10 µg/ml) detektiert. Die Jurkat AMI-BetaC-CD3 Zeta-Zellen sind mit durchgehender schwarzer Linie und die Jurkat-LV-Zellen mit gestrichelter Linie dargestellt **(B.)**.

Die FACS-Ergebnisse konnten zusätzlich durch eine mikroskopische Analyse bestätigt werden (Abb. 34). Durch die native Färbung der Zellen wurde die Oberflächenexpression des chimären Rezeptors und die Bindung des löslichen PSCA als Ringfluoreszenz detektiert. Die als negative Kontrolle mitgeführten Jurkat-LV-Zellen blieben negativ.

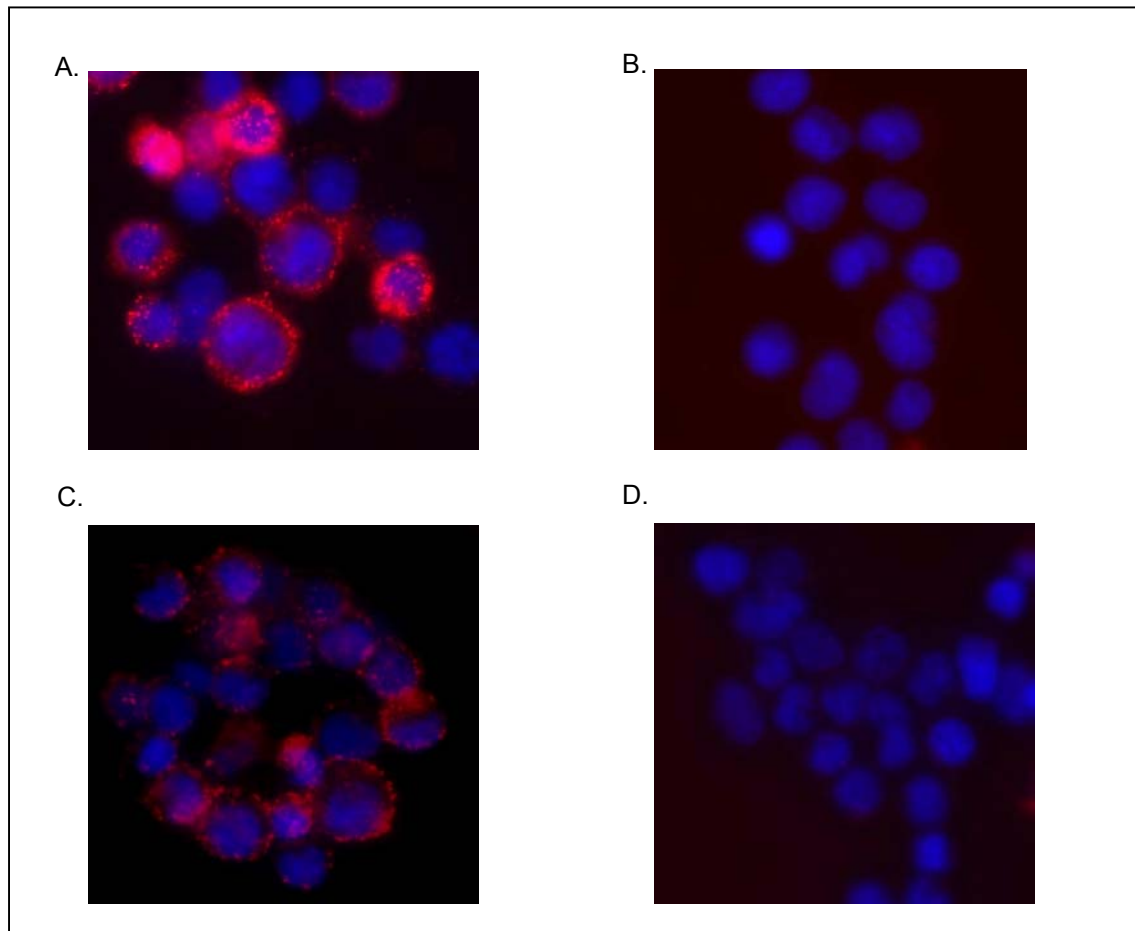


Abb.34 Immunzytochemischer Nachweis der Bindung des löslichen PSCA an die chimären Jurkat-AMI-BetaC CD3 Zeta-Zellen (**A.**) und an die Jurkat-LV-Zellen (**B.**). Die native Färbung erfolgte unter Verwendung des sPSCA (10 µg/ml vom Elutionsschritt 3), des anti-*c-myc* Ak (10 µg/ml) und des Ziege-F(ab)₂-anti-Maus Ig-PE Ak (10 µg/ml). Immunzytochemischer Nachweis der Oberflächenexpression des chimären Rezeptor auf den AMI-BetaC-CD3 Zeta Jurkat-Zellen (**C.**) und auf den Jurkat-LV-Zellen (**D.**). Die Detektion erfolgte mit Hilfe des anti-scFv-Cy3 Ak (10 µg/ml). Die Kerngegenfärbung wurde mittels Hoechst 33342 durchgeführt.

3.4.2. Konstruktion eines chimären CD28-Rezeptors

Für die Generierung eines chimären CD28-Rezeptors wurde im ersten Schritt die gesamte kodierende Region für das humane CD28-Molekül mit Hilfe von spezifischen Primern isoliert. Das PCR-Produkt wurde in den pCR3.1-Uni-Vektor kloniert. Das isolierte DNA-Fragment enthielt die gesamte cDNA-Sequenz des CD28-Moleküls ohne das Start-Kodon und die Leader-Sequenz. Die über die PCR zugefügten Schnittstellen *Cla*I am 5'-Ende und *Kpn*2I am 3'-Ende wurden für die Umklonierung in den retroviralen pcz-CFG5.1-MCS, ebenfalls verdaut mit *Cla*I und *Kpn*2I, genutzt. Für die Fusion des Einzelkettenantikörpers „AMI“ mit dem CD28-

Molekül wurde eine PCR-Reaktion mit dem Vektor pSecTag2B-AMI als Matrize durchgeführt. Dadurch wurden das *c-myc*-Epitop, der His₆-Tag und das Stop-Kodon deletiert. Das PCR-Produkt wurde direkt in den pCR3.1-Uni Vektor subkloniert. Für die Umklonierung in den retroviralen pcz-CFG5.1-CD28 Vektor, behandelt mit *Eco*RI, Klenow-Polymerase und mit *Cla*I, wurde das verkürzte AMI-Konstrukt mit *Eco*RV und *Cla*I verdaut. Das gesamte AMI-CD28-Konstrukt ist in der Abbildung 35 schematisch dargestellt.

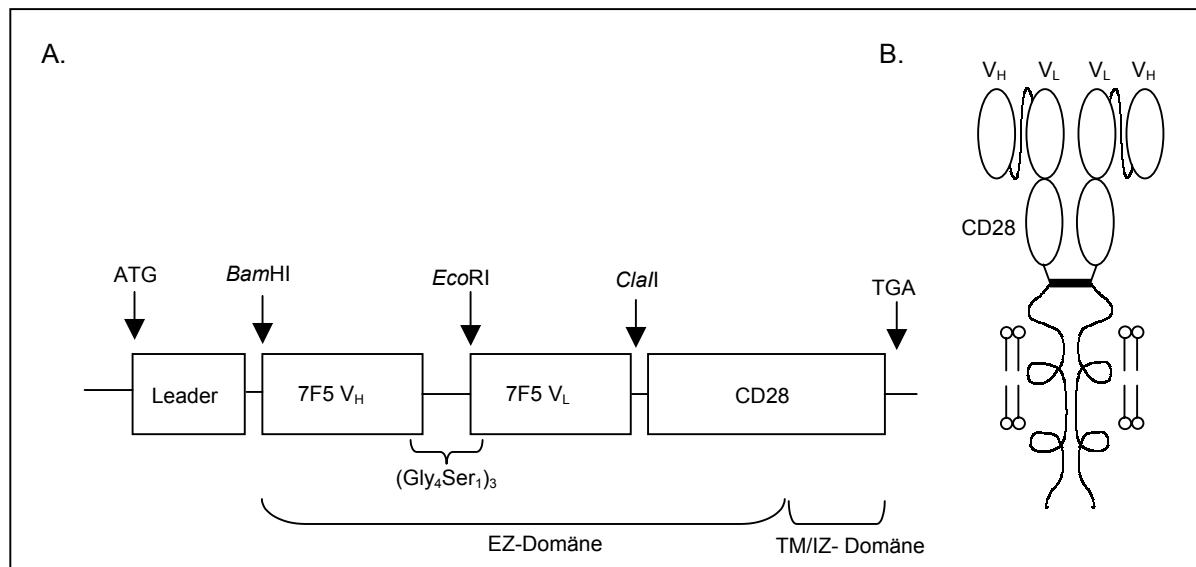


Abb.35 (A.) Schematische Darstellung des chimären AMI-CD28-Konstruktes im retroviralen Vektor pcz-CFG5.1-MCS. Mittels PCR wurde der Einzelkettenantikörper „AMI“ verkürzt (Deletion des *c-myc*-Epitops, des His₆-Tags und des Stop-Kodons) und in den retroviralen pcz-CFG5.1-CD28 Vektor umkloniert. Die Fusion des „AMI“ mit dem CD28-Molekül wurde unter Einsatz der *Eco*RI und *Cla*I Restriktionsenzymen durchgeführt. Die extrazelluläre (EZ), Transmembran- (TM) und die intrazelluläre (IC) Domänen des AMI-CD28-Rezeptors wurden gekennzeichnet.

(B.) Schematische Darstellung des AMI-CD28-Konstruktes als Zelloberflächen-exprimierter Rezeptor. Der extrazelluläre Teil des Rezeptors besteht aus dem Einzelkettenantikörper „AMI“ (V_H-Linker-V_L) und der extrazellulären Domäne des CD28-Moleküls. Die Transmembrandomäne und die intrazellulären Domänen stammen ebenfalls vom CD28-Molekül.

Die ersten Oberflächenexpressionsanalysen des neu generierten AMI-CD28-Rezeptors wurden in HEK293-Zellen durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen mit dem pcz-CFG5.1-AMI-BetaC2-Vektor mittels Lipofektion transfiziert. Die positiven Zellen wurden unter Einsatz von Zeocin (0,3 mg/ml) selektioniert und kloniert. Mit Hilfe des monoklonalen Maus-anti-Human CD28-FITC Ak (Pharmingen) wurde eine starke Zelloberflächenexpression des chimären AMI-CD28-Rezeptors detektiert. Als negative Kontrolle wurden die HEK293-LV-Zellen mitgeführt. In der Abbildung 36 wurde die FACS-Analyse der nativen Oberflächenfärbung dargestellt.

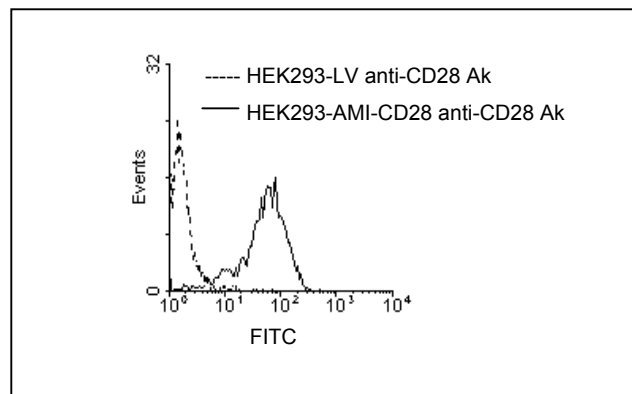


Abb.36 Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression des chimären AMI-CD28-Rezeptors. Die HEK293-LV-Zellen (gestrichelte Linie) und die HEK293-AMI-CD28-Zellen (durchgehende schwarze Linie) wurden nativ mit dem Maus-anti-Human CD28-FITC Ak (unverdünnt) gefärbt.

Für die mikroskopische Oberflächenexpressionsanalyse wurden die Zellen in Suspension aufgenommen und mit dem monoklonalen Maus-anti-Human CD28-FITC Ak nativ gefärbt. Die Aufnahmen wurden an einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop durchgeführt (Abb. 37). Die immunzytochemische Färbeanalyse bestätigte eine effiziente Oberflächenexpression der chimären AMI-CD28-Kette, die in Form einer Ringfluoreszenz detektiert werden konnte. Die HEK293-LV-Zellen blieben hingegen negativ.

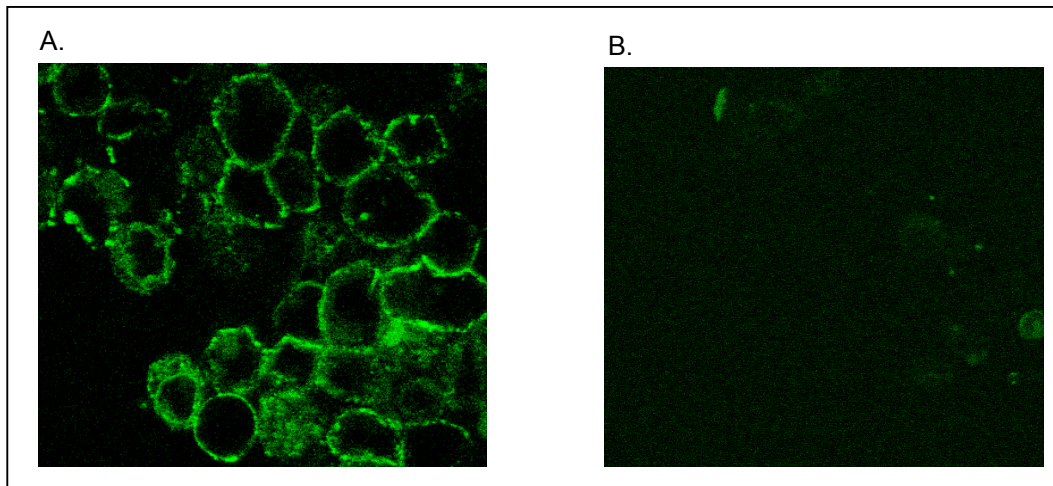


Abb.37 Immunzytochemischer Nachweis der Oberflächenexpression des chimären AMI-CD28Rezeptors auf den HEK293-Zellen. Native Färbung mit dem Maus-anti-Human CD28-FITC Ak (**A.**) von den HEK293-AMI-CD28-Zellen und (**B.**) von den HEK293-LV-Zellen.

Zum Nachweis des chimären AMI-CD28-Rezeptors wurde zusätzlich der zuvor beschriebene anti-scFv Ak eingesetzt. Hierfür wurden die Zellen in Suspension aufgenommen und mit dem Ziege-anti-Maus $F(ab)'_2$ -Cy3 Ak (anti-scFv Ak, Dianova) gefärbt. Durch anschließende Färbung mit dem monoklonalen Maus-anti-Human CD28-FITC Ak (Pharmingen) wurde die Kolokalisierung des murinen scFv-Anteils und des humanen CD28-Moleküls als Bestandteile eines chimären Proteins bestätigt. Die Oberflächenexpressionsanalyse erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Laserscanning Mikroskops (Abb. 38).

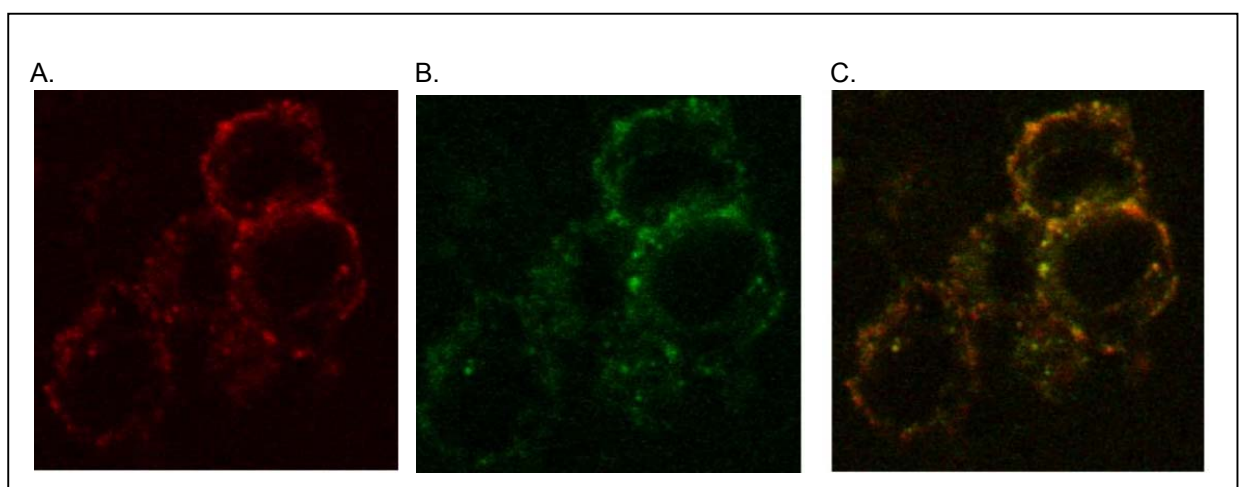


Abb.38 Immunzytochemischer Nachweis der Kolokalisierung des Einzelkettenantikörpers und des CD28-Moleküls auf der Zelloberfläche. Die HEK293-AMI-CD28-Zellen wurden nativ mit dem anti-scFv Ak (Ziege-anti-Maus $F(ab)'_2$ -Cy3 Ak 10 µg/ml) (**A.**) und anschließend mit dem

Maus-anti-Human CD28-FITC Ak (unverdünnt) **(B.)** gefärbt. Die Überlagerung von **(A.)** und **(B.)** wurde in der Abbildung **(C.)** dargestellt.

Als nächstes wurde der chimäre AMI-CD28-Rezeptor hinsichtlich seiner Bindungseigenschaften untersucht. Dies erfolgte unter Verwendung des löslichen PSCA mittels einer nativen Färbung. Hierfür wurden die Zellen mit dem über die Metallchelatchromatographie gereinigten sPSCA inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch (Abb. 39) und mikroskopisch (Abb. 40) analysiert.

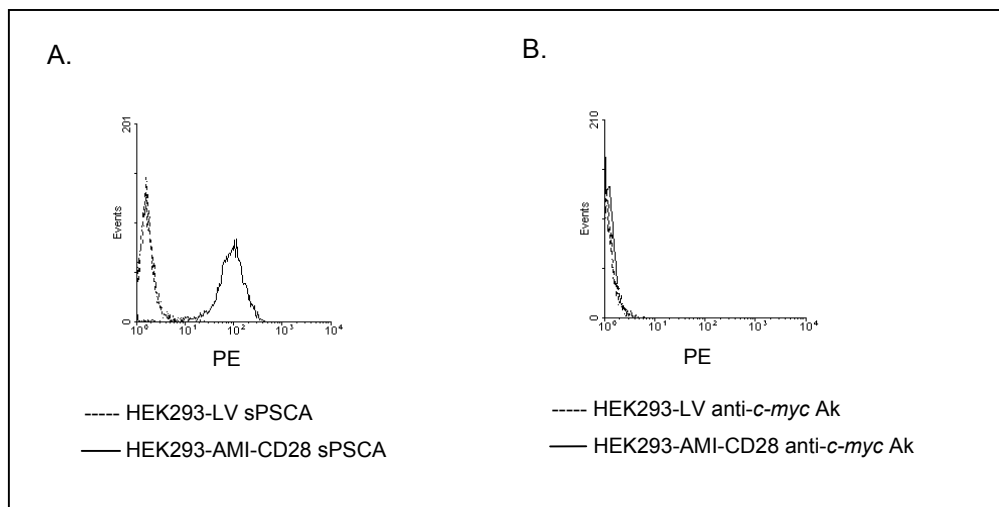


Abb.39 Durchflusszytometrische Analyse der Bindung des löslichen PSCA (sPSCA) an den chimären AMI-CD28-Rezeptor auf den HEK293-Zellen. Die Bindung von sPSCA (10 μ g/ml vom Elutionsschritt 2) wurde mit dem anti-c-myc Ak (10 μ g/ml) und dem Ziege F(ab) $'_2$ -anti Maus Ig-PE Ak (10 μ g/ml) nachgewiesen **(A.)**. Als zusätzliche negative Kontrolle wurden die Zellen nur mit dem anti-c-myc Ak und mit dem Ziege F(ab) $'_2$ -anti Maus Ig-PE Ak (10 μ g/ml) gefärbt **(B.)**. Die HEK293-AMI-CD28-Zellen sind mit durchgehender solider Linie und die HEK293-LV-Zellen mit gestrichelter Linie eingezeichnet.

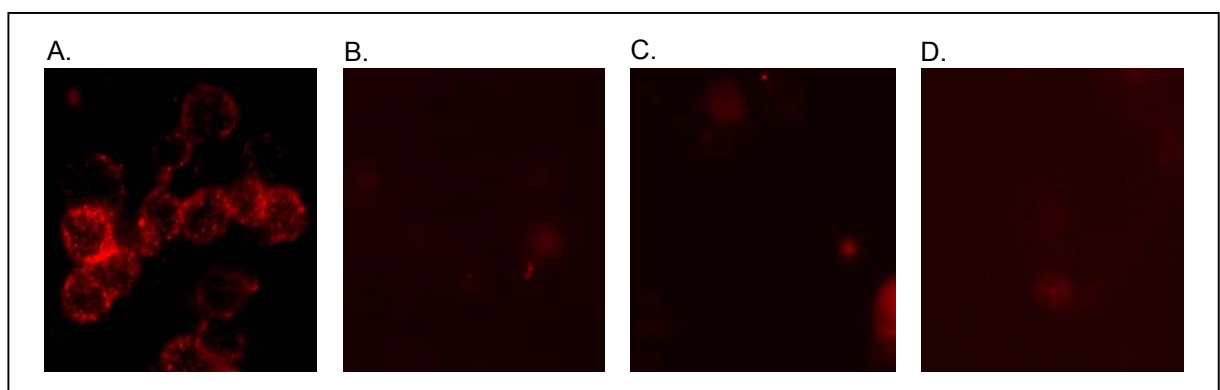


Abb.40 Immunzytochemischer Nachweis der Bindung des löslichen PSCA (sPSCA) an den chimären AMI-CD28-Rezeptor. HEK293-AMI-CD28-Zellen (**A.**) und die HEK293-LV-Zellen (**B.**) wurden nativ mit dem sPSCA (10 µg/ml vom Elutionsschritt 2), dem anti-*c-myc* Ak (10 µg/ml) und dem Ziege-F(ab)₂-anti-Maus Ig-PE Ak (10 µg/ml) gefärbt. Als negative Kontrolle dienten zusätzlich die HEK293-AMI-CD28-Zellen (**C.**) und die HEK293-LV-Zellen (**D.**), die ohne Vorinkubation mit dem sPSCA nur mit dem anti-*c-myc* Ak (10 µg/ml) und den Ziege-F(ab)₂-anti-Maus Ig-PE Ak (10 µg/ml), gefärbt wurden.

Sowohl die FACS- als auch die immunzytochemische Analyse demonstrieren eine effiziente Bindung des löslichen Antigens an die AMI-CD28-positiven HEK293-Zellen, die als Ringfluoreszenz detektiert werden konnte. Die HEK293-LV-Zellen zeigten hingegen keine PSCA-Bindung. Die Oberflächenexpression und die Bindungseigenschaften des chimären AMI-CD28-Rezeptors wurden anschließend in den J.RT3-T3.5-Zellen untersucht. Hierfür wurden die Zellen mit den retroviralen Partikeln transduziert. Da die J.RT3-T3.5-Zellen kein endogenes CD28-Molekül auf ihrer Oberfläche exprimieren, konnte der chimäre AMI-CD28-Rezeptor durch die native Färbung mit dem Maus-anti-Human anti-CD28-FITC Ak in hoher Dichte detektiert werden. Als negative Kontrolle wurden die J.RT3-T3.5-LV-Zellen mitgeführt (Abb. 41).

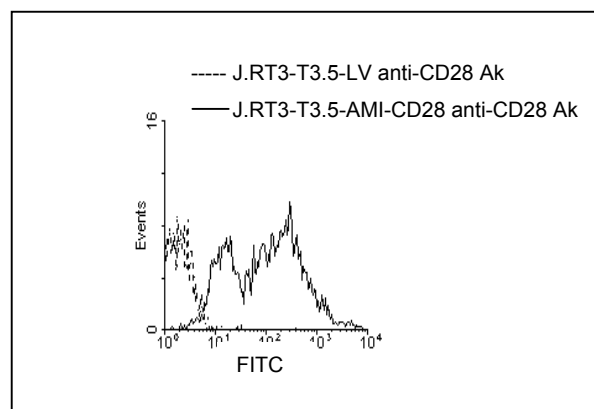


Abb.41 Durchflusszytometrische Analyse der Transduktionseffizienz der J.RT3-T3.5-Zellen. Mittels nativer Färbung der J.RT3-T3.5-LV-Zellen (gestrichelte Linie) und der J.RT3-T3.5-AMI-CD28-Zellen (durchgehende schwarze Linie) mit dem monoklonalen Maus-anti-Human CD28-FITC Ak (unverdünnt) wurde die Oberflächenexpression des chimären Rezeptors nachgewiesen.

Mittels einer Doppelfärbung wurde die gleichzeitige Oberflächenexpression des chimären AMI-CD28-Rezeptors durch Bindung des löslichen PSCA durchflusszytometrisch (Abb. 42) und mikroskopisch (Abb. 43) untersucht. Beide

Analysen lieferten eindeutige Beweise für eine effiziente und spezifische Bindung des löslichen Antigens an den chimären membranständigen AMI-CD28-Rezeptor. Durch die Überlagerung der detektierten Ringfluoreszenzen konnte die Kolokalisierung des Rezeptors und des gebundenen Antigens demonstriert werden.

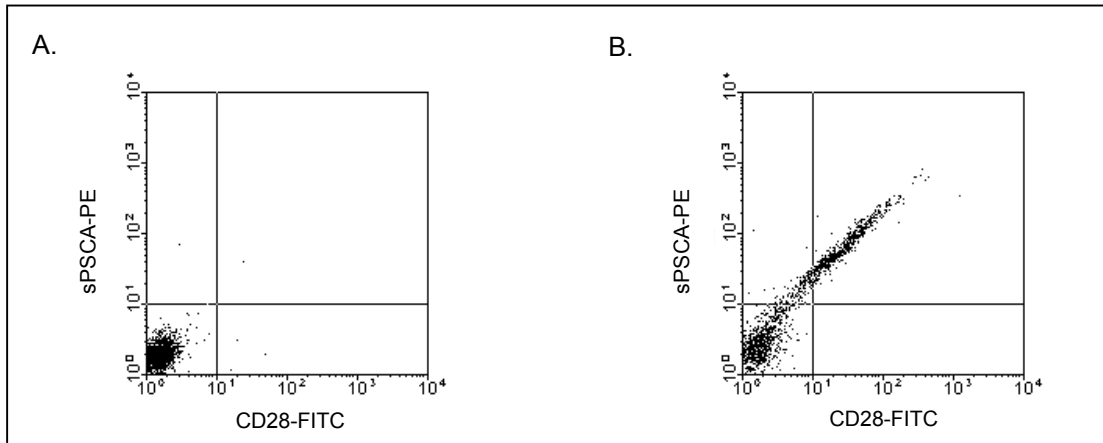


Abb.42 Durchflusszytometrische Analyse der Bindung des löslichen PSCA an den auf der Oberfläche exprimierten chimären AMI-CD28-Rezeptor. Native Färbung von J.RT3-T3.5-LV-Zellen **(A.)** und von J.RT3-T3.5-AMI-CD28-Zellen **(B.)** mit dem sPSCA (10 µg/ml, Elutionsschritt 3), dem anti-*c-myc* Ak (10 µg/ml) und dem Ziege-F(ab)₂-anti-Maus Ig-PE Ak (10 µg/ml) zur Detektion der Antigenbindung. Die Expression des chimären AMI-CD28-Rezeptors wurde mit Hilfe des monoklonalen Maus-anti-HumanCD28-FITC Ak (unverdünnt) ermittelt.

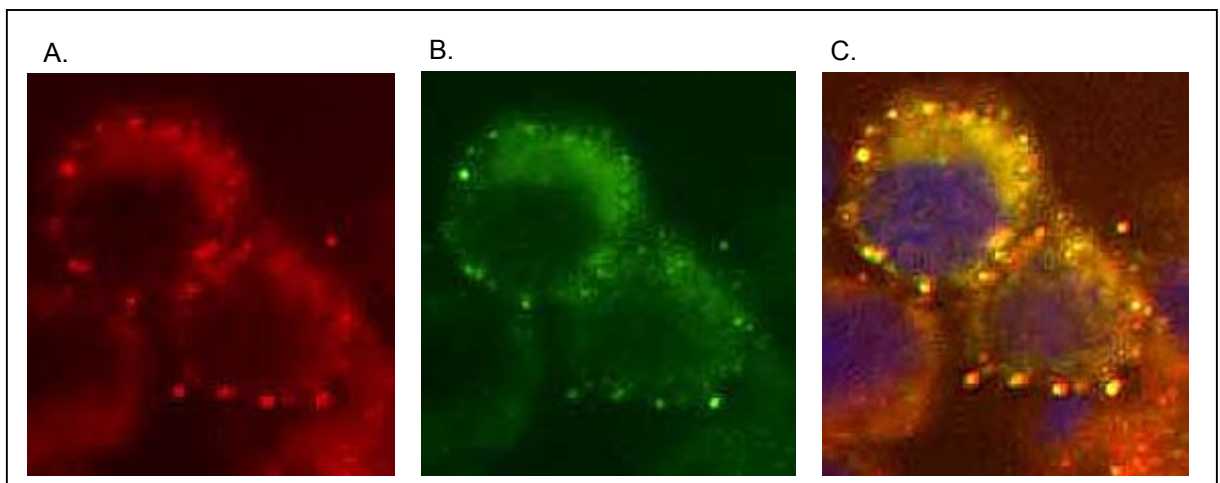


Abb.43 Immunzytochemischer Nachweis der Bindung des löslichen PSCA an den chimären AMI-CD28-Rezeptor. Die transduzierten J.RT3-T3.5-Zellen wurden nativ mit dem sPSCA (10 µg/ml, Elutionsschritt 3), dem anti-*c-myc* Ak (10 µg/ml) und dem Ziege-F(ab)₂-anti-Maus Ig-PE Ak (10 µg/ml) zur Detektion der Antigenbindung **(A.)**, bzw. mit dem monoklonalen Maus-anti-Human CD28-FITC Ak (unverdünnt) **(B.)** gefärbt. Die Überlagerung von **(A.)** und **(B.)** wurde in der Abbildung **(C.)** dargestellt. Die Kerngegenfärbung wurde mittels Hoechst 33342 durchgeführt.

3.5. Stimulation der Zellen über die chimären AMI-Rezeptoren

3.5.1. Stimulation der Zellen über den chimären AMI-BetaC-CD3 Zeta-Rezeptor

Die mit dem chimären AMI-BetaC-CD3 Zeta-Rezeptor modifizierten Zellen sollten in der Lage sein, das spezifische Antigen MHC-unabhängig zu erkennen und dadurch zur Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade induziert werden. Zu den frühen Aktivierungsereignissen gehört die Phosphorylierung der ITAM-Sequenzen, die innerhalb der intrazellulären Domäne der Zeta-Kette lokalisiert sind. Die funktionelle Tauglichkeit der AMI-BetaC-CD3-Kette als chimärer Rezeptor wurde unter Einsatz der transduzierten Jurkat-Zellen untersucht. Abgesehen von der bereits vorgestellten immunzytochemischen und durchflusszytometrischen Oberflächenexpressionsuntersuchungen wurde die Expression des chimären Proteins mittels einer Western Blot-Analyse ermittelt. Die Aufnahme der Zelllysate in einen reduzierenden Probenpuffer resultierte in der Detektion der monomeren Form sowohl der chimären AMI-BetaC-CD3 ζ -Kette (ca. 70 kDa) als auch der endogenen ζ -Kette (16 kDa) (Abb.44 A.). Ob die chimäre ζ -Kette auch zur Dimerisierung fähig ist, wurde durch die Aufnahme der Zelllysate in einen nicht reduzierenden Probenpuffer untersucht. Die auf der Höhe von 32 kDa auftretende distinkte Bande entspricht der dimeren Form der endogenen ζ -Kette. Die chimäre AMI-BetaC-CD3 ζ -Kette wurde sowohl als ein Homodimer (ca. 140 kDa) als auch als ein Heterodimer mit der endogenen ζ -Kette (ca. 85 kDa) detektiert. Die auf der Höhe von 70 kDa erschienene Bande entspricht der monomeren Form des chimären AMI-BetaC-CD3 ζ -Rezeptors (Abb. 44 B.).

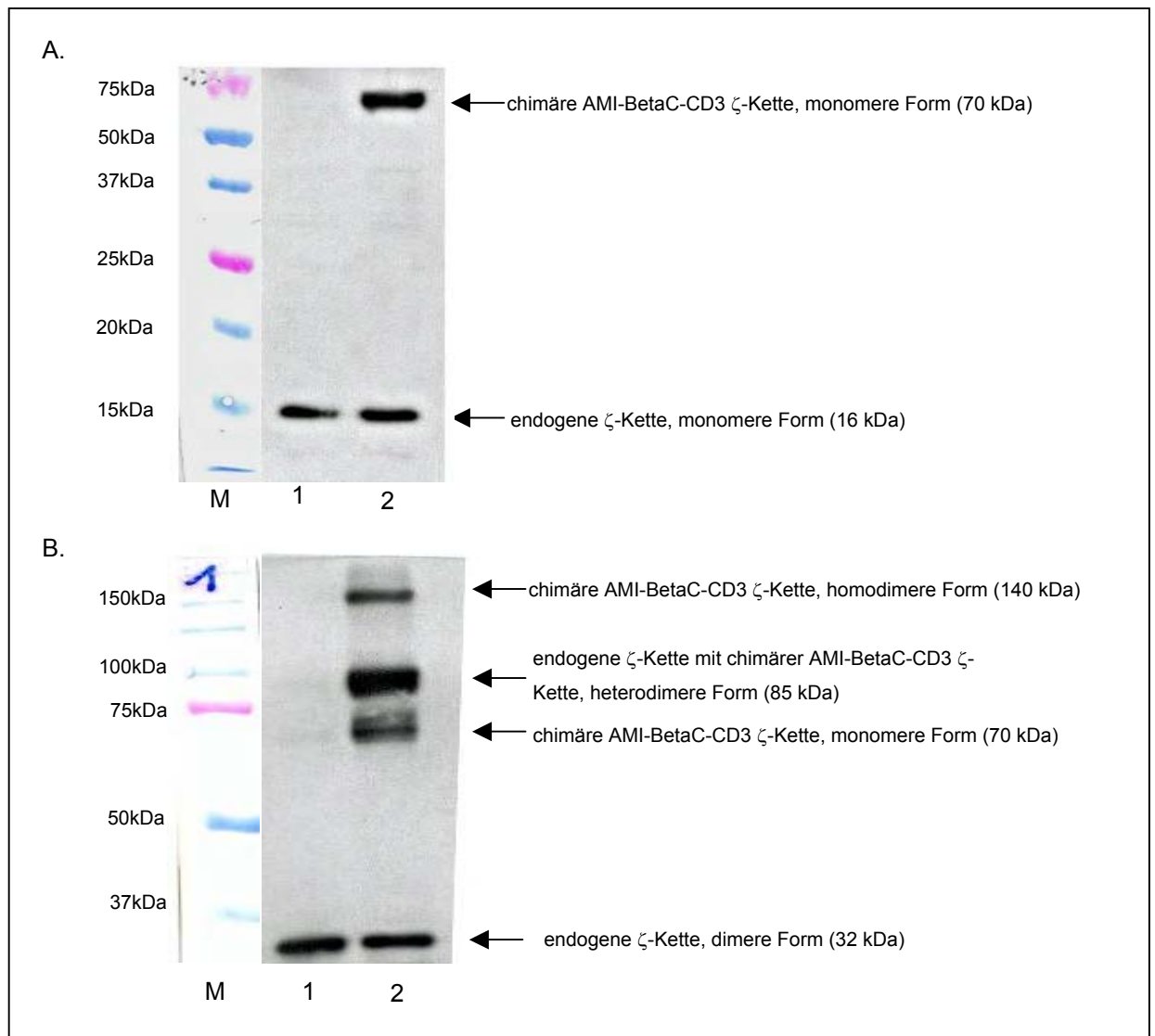


Abb.44 Western Blot-Analyse des chimären AMI-BetaC-CD3 ζ -Proteins in Lysaten der transduzierten Jurkat-LV-Zellen (Spur 1) und der transduzierten Jurkat-AMI-BetaC-CD3 ζ -Zellen (Spur 2). Je 20 μ g der Zelllysate wurden auf einem 12% SDS-Polyacrylamidgel unter reduzierenden Laufbedingungen (**A.**) bzw. auf einem 8% SDS-Polyacrylamidgel unter nicht reduzierenden Laufbedingungen (**B.**) aufgetrennt und mit Hilfe des monoklonalen anti-CD3 ζ Ak (2 μ g/ml) hinsichtlich der Expression des chimären Proteins untersucht; M Dual Color Proteinmarker (Biorad).

Für die Aktivierungsstudie wurden die transduzierten Jurkat-Zellen für 48 Stunden vor der Stimulation mit dem Antigen in FKS-freiem Medium kultiviert, um die Phosphorylierung der ζ -Kette durch die FKS-Faktoren möglichst vollständig zu reduzieren. Zur Stimulation der Zellen wurden die Antikörper an die Plastikoberfläche in zwei Kombinationen adsorbiert: 1) anti-*c-myc* Antikörper gefolgt von der Bindung

des sPSCA, 2) Kaninchen-anti-Maus Antikörper gefolgt von der Bindung des anti-CD3 Antikörpers. Nach einer Inkubationszeit von 3 h wurden die Zellen geerntet und hinsichtlich der Phosphorylierung der ζ -Kette in einer Western Blot-Analyse untersucht (Abb. 45.).

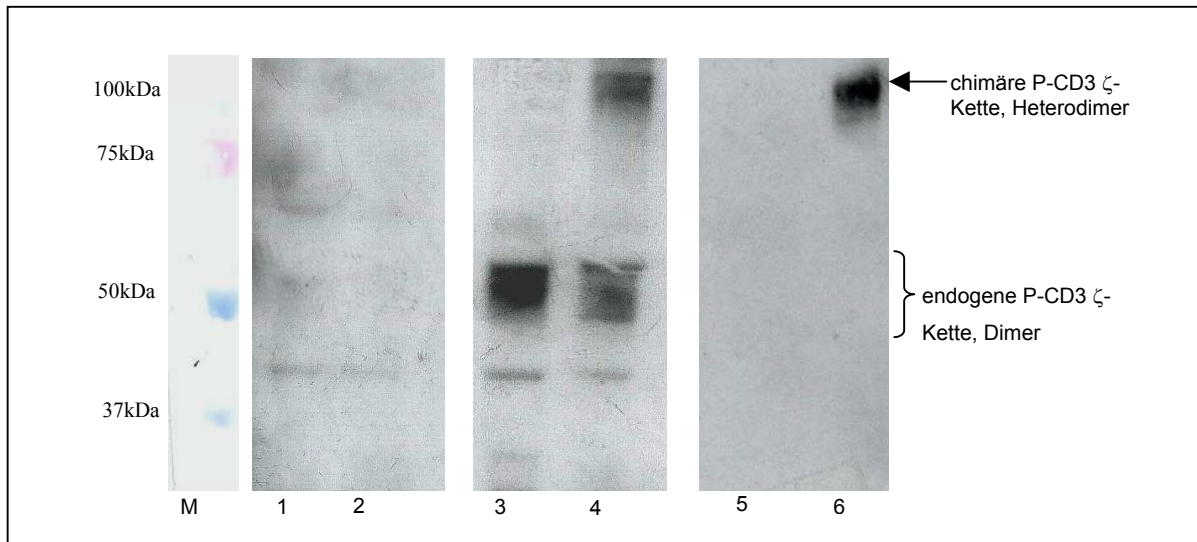


Abb.45 Western Blot-Analyse mit Zellextrakten von transduzierten Jurkat Zellen nach der Stimulation mit dem anti-CD3 Antikörper bzw. mit dem Antigen. Jeweils 5×10^5 Zellen/well in 24-well-Platte wurden mit einem Kaninchen-anti-Maus Ak (10 $\mu\text{g/ml}$) und Maus-anti-Human CD3 Ak (Okt3, 2 $\mu\text{g/ml}$) bzw. anti-*c-myc* Ak (10 $\mu\text{g/ml}$) und dem sPSCA (2 $\mu\text{g/ml}$) stimuliert. Je 20 μg Protein/Spur wurden auf ein 8%- Polyacrylamidgel aufgetragen und mit dem Maus-anti Phospho- ζ Ak (1:100 verdünnt) und dem HRP-markierten Maus-anti-Kaninchen Ig Ak (1 $\mu\text{g/ml}$) detektiert.

Spur 1: Jurkat-LV-Zellen ohne Stimulation; Spur 2: Jurkat-AMI-BetaC-CD3 ζ -Zellen ohne Stimulation; Spur 3: Jurkat-LV-Zellen Stimulation mit dem Maus-anti-Human CD3; Spur 4: Ak Jurkat-AMI-BetaC-CD3 ζ -Zellen Stimulation mit dem Maus-anti-Human CD3 Ak; Spur 5: Jurkat-LV-Zellen Stimulation mit dem sPSCA; Spur 6: Jurkat-AMI-BetaC-CD3 ζ -Zellen Stimulation mit dem sPSCA; M Dual Color Proteinmarker (Biorad).

Die Kreuzvernetzung der Rezeptoren über das auf der Plastikoberfläche immobilisierte lösliche PSCA führte zur spezifischen Phosphorylierung der AMI-BetaC-CD3 ζ -Kette, was durch die Bande von ca. 95 kDa gezeigt wurde (Abb. 45, Spur 6). Es konnte ausschließlich die heterodimere Form des chimären Proteins mit der endogenen ζ -Kette in einem phosphorylierten Zustand nachgewiesen werden. Die dabei beobachtete Erhöhung des MW von 85 auf ca. 95 kDa resultiert aus den an die ITAM-Sequenzen angefügten Phosphatgruppen. Die Inkubation der Jurkat-

LV-Zellen mit dem sPSCA führte hingegen zu keiner Aktivierung. Die Stimulation der Zellen mit dem anti-CD3 Ak induzierte neben der Phosphorylierung der ITAM-Sequenzen der endogenen ζ -Kette, was in Form von mehreren Banden mit einem MW von 42 bis 46 kDa detektierbar war, die Phosphorylierung des chimären Heterodimers, was zur Erhöhung des MW des Proteins auf ca. 95 kDa führte (Abb. 45, Spuren 3 und 4). Nach der Stimulation der Jurkat-LV-Zellen mit dem anti-CD3 Antikörper konnte ausschließlich die Phosphorylierung der endogenen ζ -Kette nachgewiesen werden.

3.5.2. Stimulation der Zellen über den chimären AMI-CD28-Rezeptor

Im nächsten Schritt wurde der neu generierte AMI-CD28-Rezeptor hinsichtlich der Fähigkeit zur Induktion einer Signalkaskade nach der Antigenbindung mit Hilfe eines monoklonalen Kaninchen-anti-Phospho-Akt-Antikörpers (Cell Signalling) untersucht. Da die J.RT3-T3.5-Zellen kein endogenes CD28-Molekül aufweisen und möglicherweise durch zusätzliche Mutationen in der Signaltransduktionskette gekennzeichnet sind, wurden für die Aktivierungsstudien über den chimären AMI-CD28-Rezeptor die Jurkat-Zellen herangezogen. Die Expression des Rezeptors in den transduzierten Jurkat-Zellen wurde neben der immunzytochemischen und durchflusszytometrischen (unter Verwendung des anti-scFv Ak und des löslichen PSCA) zusätzlich mittels einer Western Blot-Analyse untersucht (Abb. 46).

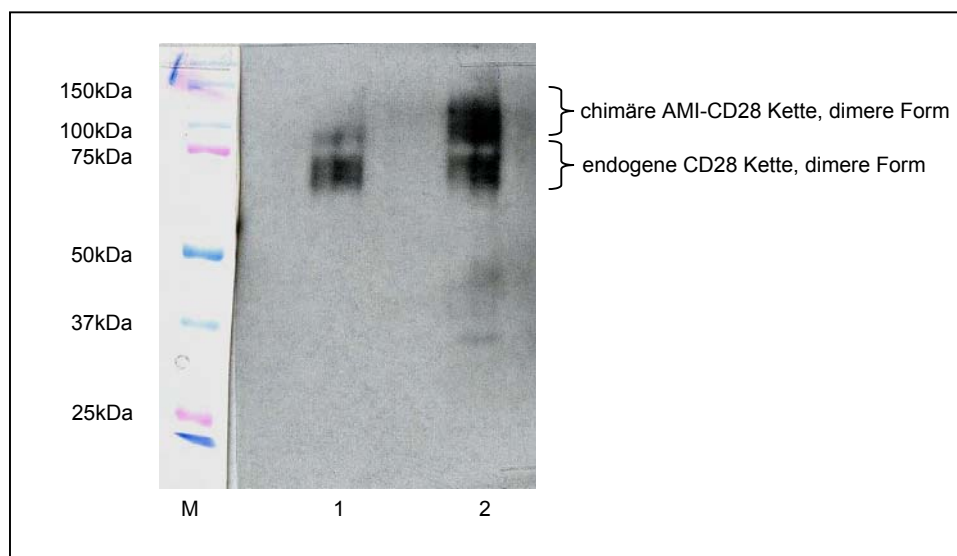


Abb.46 Western Blot-Analyse des chimären AMI-CD28-Proteins mit den Zelllysaten der transduzierten Jurkat-LV-Zellen (Spur 1) und der transduzierten Jurkat-AMI-CD28-Zellen (Spur 2). Je 20µg der Zelllysate wurden in 8% SDS-Polyacrylamidgel in nicht reduzierendem Probenpuffer aufgetrennt und mit Hilfe des monoklonalen anti-CD28 Ak (2µg/ml) hinsichtlich der Expression des chimären Proteins untersucht.

Die unter nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführte Western Blot-Analyse ermöglichte die Detektion der Expression des chimären Proteins in den transduzierten Jurkat AMI-CD28-Zellen. Der extrazelluläre Anteil des CD28-Proteins besitzt fünf potenzielle N-Glykosylierungsstellen. Die vollständig glykosylierte endogene heterodimere Form des CD28-Moleküls erscheint auf der Höhe von ca. 90 kDa. Die nicht vollständig glykosylierten Proteine wurden in Form von mehreren Banden mit einem MW von ca. 70 bis 75 kDa detektiert. Durch die Fusion der CD28-Kette mit dem scFv „AMI“ wurde ein chimäres Protein mit einem MW von ca. 70 kDa generiert. In den Zelllysaten der AMI-CD28 transduzierten Jurkat-Zellen wurden neben den Homodimeren mit einem geschätzten MW von 140 kDa auch eine Formation von Heterodimeren mit der endogenen CD28-Kette (MW von ca. 100 kDa) nachgewiesen. Die in dem Bereich von 100-140 kDa detektierten Banden sind auf das Vorkommen von in unterschiedlichem Ausmaß glykosylierten Proteinen in den Heterodimeren zurückzuführen.

Für die Aktivierungsassays wurden die Effektorzellen für zwei Tage vor der Stimulation mit dem Antigen in FKS-freiem Medium kultiviert, um die Phosphorylierung der Akt-Kinase durch FKS-Komponenten zu reduzieren. Zur Stimulation der Zellen wurden die Antikörper an die Plastikoberfläche in zwei Kombinationen adsorbiert: 1) anti-*c-myc* Antikörper gefolgt von der Bindung des sPSCA, 2) Kaninchen-anti-Maus Antikörper gefolgt von der Bindung des anti-CD28 Antikörpers. Nach einer Inkubationszeit von 1 h wurden die Zellen geerntet und zur Herstellung der Zelllysate in RIPA-Puffer aufgenommen. Die Antigen-spezifische Phosphorylierung der Akt-Kinase wurde in der Western Blot-Analyse nachgewiesen (Abb. 47).

Die Stimulation der AMI-CD28-transduzierten Jurkat-Zellen mit dem über das *c-myc*-Epitop immobilisierten löslichen PSCA resultierte in der Aktivierung der Akt-Kinase, die als distinkte Bande auf der Höhe von 60 kDa detektiert wurde. Die mit dem LV transduzierten Jurkat-Zellen zeigten hingegen keine Aktivierung. Durch die

Inkubation mit dem anti-CD28 wurde ein Aktivierungssignal sowohl in den Jurkat-LV- als auch in den Jurkat-AMI-CD28-Zellen ausgelöst.

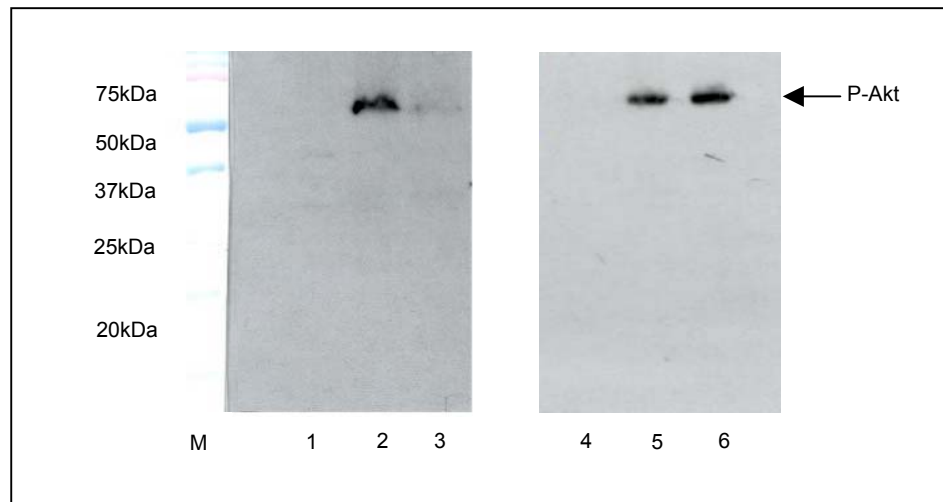


Abb.47 Western Blot-Analyse mit Zellextrakten von transduzierten Jurkat-Zellen nach der Stimulation mit dem anti-CD28 Antikörper bzw. mit dem Antigen. Jeweils 5×10^5 Zellen/well in 24-well-Platte wurden mit einem Kaninchen-anti-Maus Ak (10 $\mu\text{g/ml}$) und Maus-anti-Human CD28 Ak (2 $\mu\text{g/ml}$) bzw. anti-*c-myc* Ak (10 $\mu\text{g/ml}$) und sPSCA (2 $\mu\text{g/ml}$) stimuliert. Je 20 μg Protein/Spur wurden auf ein 10%-Polyacrylamidgel aufgetragen und mit dem Kaninchen-anti Phospho-Akt Ak (1:1000 verdünnt) und dem HRP-markierten Maus-anti-Kaninchen Ig Ak (1 $\mu\text{g/ml}$) detektiert.

Spur 1: Jurkat-LV-Zellen ohne Stimulation; Spur 2: Jurkat-LV-Zellen Stimulation mit dem Maus-anti-Human CD28 Ak; Spur 3: Jurkat-LV-Zellen Stimulation mit sPSCA; Spur 4: Jurkat-AMI-CD28-Zellen ohne Stimulation; Spur 5: Jurkat-AMI-CD28-Zellen Stimulation mit dem Maus-anti-Human CD28 Ak; Spur 6: Jurkat-AMI-CD28-Zellen Stimulation mit sPSCA; M Dual Color Proteinmarker (Biorad).

4. Diskussion

Die Effektivität einer adoptiven, zellulären Immuntherapie von Tumorerkrankungen wird hauptsächlich durch schwache Immunogenität der malignen Zellen, durch den immunsupprimierten Zustand der Patienten im fortgeschrittenen Krankheitsstadium, durch Schwierigkeiten bei der Generierung von ausreichenden Mengen an autologen Tumor-spezifischen T-Lymphozyten und deren schwache Proliferation mit zeitlich limitierter Persistenz stark eingeschränkt. Andererseits stellen bei einer Antikörper-abhängigen Immuntherapie die schwache Tumorpenetration und eine kurze Halbwertszeit der verabreichten Tumor-spezifischen monoklonalen Antikörper die Haupthindernisse dar. Die Versuche zur Erhöhung der Wirksamkeit beider Therapieformen führten zur Entwicklung einer neuen Strategie, die auf chimären T-Zell-Rezeptoren basiert. Diese vereint die Vorteile der zellulären Therapieform, nämlich die effiziente Tumorpenetration, die Zytotoxizität und die Freisetzung von stimulierenden Zytokinen, mit denen der humoralen Therapieform wie die MHC-unabhängige Antigenerkennung. Aufgrund der Oberflächenexpressions-eigenschaften wie: starke Korrelation mit ansteigendem Gleason-Score und Tumorstadium [96] und Überexpression auf androgen-unabhängigen Zellen und Knochenmetastasen [97] wurde das PSCA als attraktives Zielantigen einer adjuvanten auf chimären Rezeptoren-basierenden Immuntherapie zur Behandlung vom fortgeschrittenen hormonrefraktären Prostatakarzinom gewählt. In den bis heute publizierten Studien wurden chimäre Rezeptoren mit PSMA [211, 212] und ErbB2 [213] als Zielantigene konstruiert. Die dabei beobachtete *in vitro* und *in vivo* Effektivität liefert überzeugende Hinweise für das klinische Potenzial dieser Art der Immuntherapie zur Behandlung des Prostatakarzinoms.

4.1. Generierung eines neuen starkreaktiven monoklonalen PSCA-spezifischen Antikörpers

Die wichtigste Voraussetzung bei Generierung von chimären Rezeptoren ist die Existenz eines TAA-spezifischen, monoklonalen Antikörpers als Grundlage für die Antigen-bindenden Domäne des Rezeptors. Die erste Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand daher in der Herstellung eines PSCA-spezifischen Antikörpers. Da für die Generierung von chimären Rezeptoren es essenziell ist, dass der monoklonale

Antikörper die native Form des Oberflächenproteins erkennt, wurden für die Immunisierung der Mäuse P815-Zellen eingesetzt, die im Vorfeld genetisch zu einer hohen PSCA-Oberflächenexpression modifiziert wurden. Dies wurde gewährleistet durch eine heterologe Expression des Proteins unter Kontrolle eines starken viralen CMV-Promotors. Da die Durchflusszytometrie zur schnellen und quantitativen Multiparameter-Analyse von Einzelzellen auf Basis der Bindung fluoreszenzmarkierter Antikörper eine effiziente Methode darstellt, wurde diese Technik zur Identifikation von Hybridomklonen, die das membranständige, native PSCA auf den transfizierten HEK293-PSCA-Zellen erkennen, genutzt. Der durch das Screening-Verfahren isolierte 7F5 Klon zeichnete sich durch besonders hohe Färbeintensität der PSCA-positiven Zellen aus, wogegen die mitgeführten Kontrollen negativ blieben. Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Anfärbung vom PSCA sowohl auf den Transfektanden als auch auf der nativ PSCA-exprimierenden HT1376-Zelllinie. Die Bindungsstärke des neuen PSCA-spezifischen 7F5 Antikörpers war 100-fach höher als die des bereits publizierten 8D11.2E9 Antikörpers [125]. Eine hohe Bindungsstärke des monoklonalen Antikörpers ist wichtig für effiziente monovalente Antigenbindung eines Einzelkettenantikörpers. Die zusätzlichen mikroskopischen Analysen unter Einsatz von HT1376-Zellen lieferten überzeugende Beweise für die spezifische Bindung des Antikörpers an das oberflächenexprimierte PSCA, was an der Ringfluoreszenz deutlich zu erkennen ist. In weiteren Untersuchungen wurde gezeigt, dass der neu generierte 7F5 Ak ebenfalls für den Nachweis von denaturiertem PSCA in Western Blotting-Analysen eingesetzt werden kann.

4.2. Mögliche therapeutische Verwendung des neuen PSCA-spezifischen 7F5 Antikörpers

Die Spezifität vom PSCA für Prostatazellen sowie für Blasenkarzinom- und Glioblastomzellen (persönliche Mitteilung von A. Temme) weist auf eine potenzielle Applikation des neuen Antikörpers in der Diagnostik hin. Da zusätzlich noch zwei weitere anti-PSCA Antikörper hergestellt wurden, könnte ein „Capture ELISA“ zur Bestimmung von löslichem PSCA im Serum von Prostatakarzinom-Patienten entwickelt werden. In wie weit mit einer Absättigung der chimären Rezeptoren durch lösliches PSCA zu rechnen ist muss in weiteren Untersuchungen abgeklärt werden.

Die therapeutische Anwendungsmöglichkeit des 7F5 Antikörpers als ein Bestandteil einer adjuvanten Immuntherapie zur Behandlung des fortgeschrittenen und metastasierenden Prostatakarzinoms sowie der minimalen Tumorrestkrankungen müsste in weiteren *in vitro* und *in vivo* Studien etabliert werden. Der IgG1-Isotyp des 7F5 Antikörpers ermöglicht die Aktivierung der wesentlichen Antikörper-basierten Mechanismen wie ADCC (Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität) und CDC (Komplement-vermittelte Zytotoxizität). Ob das PSCA nach der Antikörperbindung weiterhin stabil auf der Zelloberfläche exprimiert bleibt oder auch als Komplex ins Serum freigesetzt bzw. internalisiert wird, wodurch die Induktion der oben genannten zytotoxischen Mechanismen inhibiert wäre, müsste zusätzlich untersucht werden. Andererseits konnte trotz der Internalisierung des PSCA-spezifischen Antikörpers eine effiziente Tumor-Regression in einem Mausmodell demonstriert werden [125]. Korrespondierend dazu konnte in einer *in vivo* Studie von Safran et al. eine durch Antikörperkonzentration beeinflusste signifikante Verlangsamung des Wachstums sowohl von Androgen-abhängigen als auch von Androgen-unabhängigen Prostatakrebszellen gezeigt werden [100]. Die dabei festgestellte Inhibition der Metastasierung deutete darauf hin, dass PSCA bei der Entstehung und Progression des Prostatakarzinoms durch die Beeinflussung der Transformation und Proliferation von Prostatazellen eine Rolle spielt [126]. Das mögliche therapeutische Potenzial vom 7F5 bei der Inhibierung des Tumorwachstums und der Metastasierung müsste in einem Mausmodell mit humanen Prostatakarzinom-Xenografts untersucht werden.

4.3. Isolierung der variablen Domänen des 7F5 Antikörpers

Die starke Bindung des neuen PSCA-spezifischen 7F5 Antikörpers war Anlass für die Herstellung der scFv-Fragmente. Für deren Gewinnung aus Hybridomzellen mussten zuerst die beiden Genfragmente für die variable schwere und leichte Kette isoliert werden. Dies wurde durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von antikörperspezifischen Primern durchgeführt. Aufgrund der ausgeprägten Sequenzvariabilität über den gesamten V-Gen Bereich hinweg gestaltet sich die Generierung von geeigneten Oligonukleotidprimern als besonders schwierig. Zwar gibt es besonders hoch variable Bereiche, die als HV (hypervariable Regionen) oder CDR (komplementaritätsbestimmende Regionen) bezeichnet werden

und die entscheidend für die Antigenbindung und die Spezifität des Antikörpers sind, aber die dazwischen liegenden Bereiche weisen ebenfalls eine, wenn auch geringe Variabilität auf. Sie werden als Gerüstregionen (*framework regions*, FR) bezeichnet, und sind für die Struktur der variablen Domänen verantwortlich (Abb. 48) [127].

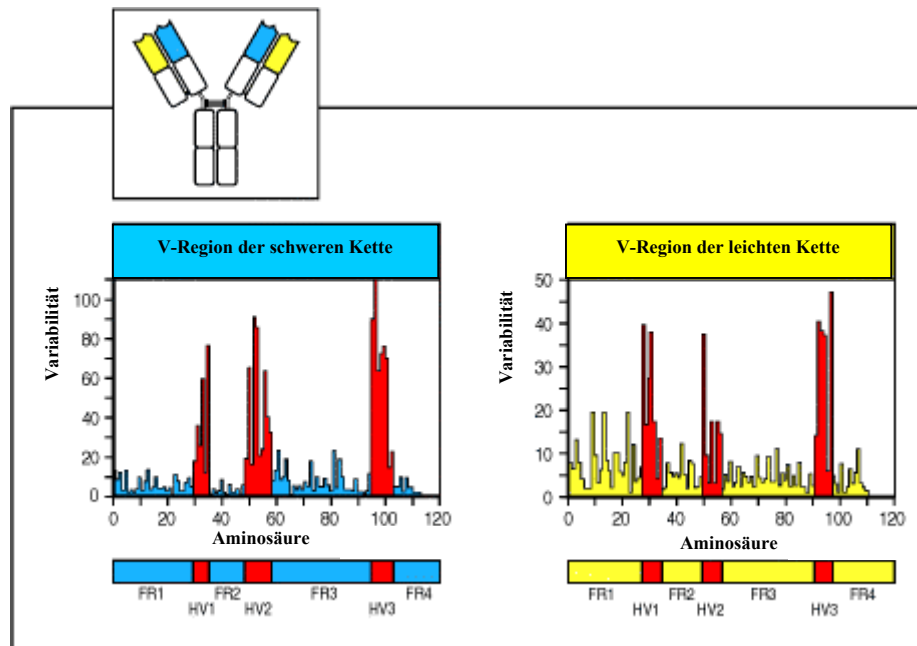


Abb.48 Sequenzvergleichsanalyse von variablen Regionen aus einer schweren und einer leichten Kette eines Antikörpers. Der Variabilitätsgrad an jeder Aminosäureposition ist gleich dem Quotienten aus der Anzahl verschiedener Aminosäuren, die an der entsprechenden Stelle bei der Betrachtung von allen Sequenzen vorkommen, und der Häufigkeit der an dieser Stelle üblichsten Aminosäure. Die drei hypervariablen Bereiche (HV1, HV2 und HV3, rot dargestellt) sind von weniger variablen Gerüstregionen (FR1, FR2, FR3 und FR4, für die schwere Kette blau und für die leichte Kette gelb dargestellt) umgeben (Abbildung übernommen von Janeway, C. A. und Travers, P. Immunologie, 2. Auflage, 1997, Spektrum Akademischer Verlag).

Mittels einer vergleichenden Sequenzanalyse ist es gelungen, die bereits isolierten Antikörpersequenzen aufgrund von konservierten Positionen in Subgruppen zu unterteilen [128]. In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche Versuche zur Generierung von Primern für die Amplifikation von murinen variablen Immunglobulingenen mit weit über 100 verschiedenen Sequenzen unternommen [129, 130, 131, 132, 133, 134]. Es wurden umfangreiche Oligonukleotidprimersätze konstruiert, mit denen man versucht hat, jede der murinen Immunglobulingen-Subgruppen zu erfassen. Für die Gestaltung der 3'-Primer wird meistens die

bekannte isotypspezifische, konstante Domäne als Zielsequenz verwendet. Die 5'-Primer müssen hingegen so generiert werden, damit sie mit einem Primerset möglichst viele Ig-Subgruppengene hybridisieren können. Dafür werden an einigen Positionen variable Nukleotide („wobbles“) eingebaut, wodurch mindestens ein Primer aus einem Satz an eine Antikörpersequenz binden kann. Als Zielsequenz wird dabei entweder der Leader- oder der weniger variable FR1-Bereich der murinen Immunglobulingene genutzt. Angelehnt an die bereits publizierten Primärsätze [113] erfolgte die Generierung von Oligonukleotiden für die Isolierung der für die variablen Domänen des anti-PSCA Antikörpers kodierenden Sequenzen. Da wie bereits erwähnt die Leadersequenzen der murinen Immunglobulingene noch weniger konservierte Positionen als die FR1-Region aufweisen, wurden für die Konstruktion der 5'-Primer die „*framework region1*“ als Zielsequenz genutzt. Die hoch degenerierten FR1-Primer wurden weiterhin für die anschließende Leserahmen-erhaltende Ligation der beiden variablen Domänen zu einem scFv-Konstrukt mit den passenden Restriktionsschnittstellen modifiziert. Entsprechend der Zugehörigkeit des isolierten 7F5 Antikörpers zur IgG1-Isotypklasse der murinen Immunglobuline wurde der 3'-Primer mit der Zielsequenz im 5'-Bereich der C_H1-Domäne generiert. Aufgrund der 95% -igen Expressionsrate des kappa Isotyps wurde bei der Konstruktion von Primern für die variablen leichten Ketten ausschließlich diese in Betracht gezogen. Für die Umschreibung der aus den Hybridomzellen isolierten mRNA in die cDNA wurden statt der Oligo(dT)₁₈-Primer die spezifischen Rückwärtsprimer für V_H und V_L eingesetzt. Dadurch erfolgte eine selektive reverse Transkription der nur für die V_H bzw. V_L kodierenden mRNA-Moleküle. Die Reaktionsbedingungen der PCR-Amplifikation von Antikörpergenen unter Einsatz von hoch degenerierten Primern müssen dabei im Gegensatz zu den meisten PCR-Anwendungen auf eine geringe Spezifität optimiert werden. Das Senken der Annealing-Temperatur ermöglichte die Vervielfältigung von Sequenzen, die mit einer ganzen Reihe von Nukleotiden nicht an die verwendeten Primer passten. Die Verringerung der Annealing-Temperatur auf 50°C bzw. 60°C führte zur Amplifikation der schweren bzw. leichten variablen Ketten des 7F5 Antikörpers. Trotz Optimierung der Myelom-Fusionspartner auf eine geringst mögliche Expression der eigenen Antikörpergene können diese Ketten oder andere schwach exprimierte Pseudogene bei der Amplifikation der Antikörpergene aus den Hybridomzellen koamplifiziert werden [135]. Weitere Fehlerquellen stellen Mutationen dar, die sich während der

langen Kultivierungsperiode der Hybridomzellen in den Antikörpergenen anreichern können. Um diese möglichen Fehler auszuschließen, wurden die isolierten Gene zuerst hinsichtlich ihres monoklonalen Ursprungs mittels einer vergleichenden Sequenzanalyse (multiple alignment) untersucht. Die dabei ermittelte beinahe 100%-ige Identität zwischen den jeweils für die Analyse herangezogenen zehn Klonen bestätigte die Abstammung aller isolierten Ketten-Gene von einem monoklonalen Hybridom. Die amplifizierten DNA-Sequenzen wurden anschließend hinsichtlich der Zugehörigkeit zu den Immunglobulin-Subgruppen unter Einsatz der *IgBlast* Datenbank analysiert [114]. Die isolierten Sequenzen wurden basierend auf der Kabat Datenbank in CDR- und FR-Regionen unterteilt, mit den bereits bekannten Ig-Sequenzen bezüglich der Aminosäurezusammensetzung und deren Größe verglichen und eindeutig als die für die variable schwere und leichte Domäne eines murinen Antikörpers kodierende DNA identifiziert.

4.4. Generierung eines PSCA-spezifischen Einzelkettenantikörpers

Fv-Fragmente sind nur halb so groß wie die entsprechenden Fab-Fragmente und etwa sechs Mal kleiner als ein IgG-Molekül. Da die Disulfidbrücken, die im Bereich der *hinge* Region und zwischen der konstanten Domänen der leichten und schweren Ketten vorkommen und zur Stabilisierung eines Antikörpers dienen, innerhalb eines Fv-Fragmentes nicht mehr vorhanden sind, müssen die beiden V_H- und V_L-Domänen zusätzlich stabilisiert werden [136]. Eine Möglichkeit besteht darin, die isolierten variablen Ketten mit Hilfe eines kurzen Linkers miteinander zu verknüpfen. Dadurch entsteht ein Einzelkettenantikörper (*single chain*-Antikörper, scFv), der als ein Protein translatiert wird, wodurch eine ungleichmäßige Produktion der beiden Domänen bzw. eine unerwünschte Assoziation einer der Ketten mit anderen Proteinen vermieden wird. Es gibt keine universellen, optimalen Linkersequenzen. Der Peptidlinker soll einerseits lang und flexibel genug sein, um die richtige Anordnung der beiden Domänen zueinander zu erlauben, andererseits soll er kurz genug sein, um die Assoziation der variablen Ketten zu unterstützen. Die Flexibilität des Linkers ist für die Erhaltung der Bindungseigenschaften des Einzelkettenantikörpers entscheidend und wird hauptsächlich durch die Aminosäurezusammensetzung der Peptidverbindung bestimmt. Basierend auf den Peptidsequenzen von bekannten Proteinen wurden Linker konstruiert, die aus multiplen Kopien der Gly₄Ser₁-Sequenz

bestehen. So wird gleichzeitig für eine ausreichende Flexibilität des Proteins und Unterbindung der sterischen Störungen zwischen den beiden Domänen gesorgt [121, 137, 138]. Durch die Einführung eines Linkers mit einer Länge von mehr als 12 AS, kommt es zur Formation von stabilen monomeren Einzelkettenantikörpern. Die Verkürzung der Linkersequenz führt zur Bildung von Oligomeren-Formen des Proteins, wodurch es zur Entstehung von nicht funktionellen Proteinen kommt [139]. In der Zwischenzeit sind sehr unterschiedliche Peptidverbindungen, meistens mit einer Länge von ~15-20 AS, publiziert worden [121, 137]. Basierend auf diesen zahlreichen Studien wurde für die Fusion der isolierten, variablen V_H- und V_L-Domänen des anti-PSCA Antikörpers ein (Gly₄Ser₁)₃-Linker als Bestandteil des Rückwärtsprimers für die schwere Domäne (IgG1-VH Primer) eingefügt.

4.5. Funktionalität des Einzelkettenantikörpers „AMI“

Für die Funktionalitätstests zur Untersuchung der Bindungseigenschaften des Einzelkettenantikörpers wurden die beiden über den Linker zusammengefügt Sequenzen in die sekretorische Expressionskassette des pSecTag2B-Vektors (Invitrogen) einkloniert. Für die Expression des löslichen Einzelkettenantikörpers genannt „AMI“ wurde ein eukaryotisches System unter Einsatz von humanen HEK293-Zellen verwendet, wodurch die Durchführung der posttranslationalen Modifikationen in möglichst nativer Form gewährleistet wird. Ein weiterer Vorteil beim Einsatz von HEK293-Zellen besteht in der Expression hoher Konzentrationen an Fremdproteinen [140]. Das ins Zellkulturmedium sezernierte und mit His₆-Tag versehene Protein konnte anschließend in nativer Form in mg-Mengen und hoher Reinheit mittels einer Metallchelatchromatographie gewonnen werden. Die Bindungseigenschaften des „AMI“ wurden im Rahmen von immunzytochemischen Analysen untersucht. Die nativen Färbungen der transfizierten HEK293-LV- und HEK293-PSCA-Zellen mit dem Einzelkettenantikörper „AMI“ ergaben ähnlich wie bei der Färbung mit dem parentalen 7F5 Ak, ein für Oberflächenfärbung typisches Ringfluoreszenz-Färbemuster. Das dabei detektierte punktierte Immunfluoreszenzmuster ist auf die bevorzugte Lokalisierung des Proteins in bestimmten Bereichen der Zellmembran zurückzuführen. Die GPI-verankerten Proteine treten bekannterweise konzentriert in Glycolipid-reichen Mikrodomänen auf, was wahrscheinlich eine essenzielle Rolle für die Signaltransduktion und den

molekularen Transport spielt [141, 142, 143]. Ob das PSCA tatsächlich nur innerhalb solcher Glycolipid-reichen Mikrodomänen exprimiert wird und es zur Induktion einer Signalkaskade fähig ist, muss im Rahmen von weiteren Studien untersucht werden. Trotz der von bivalent auf monovalent reduzierten Bindungseigenschaften des Einzelkettenantikörpers mit verringerter Avidität konnte eine eindeutige Bindung vom „AMI“ an das membranständige PSCA festgestellt werden. Die mit löslichen und gereinigten „AMI“ durchgeführten Bindungsanalysen lieferten eindeutige Beweise bezüglich der Funktionalität des rekombinanten Proteins und dessen Tauglichkeit als die Antigen-bindende Domäne eines membranständigen Rezeptors.

4.6. Mögliche therapeutische Verwendung des Einzelkettenantikörpers „AMI“

Ein Grund zur Generierung von Einzelkettenantikörpern war die schwache Tumorlokalisierung und damit verbundene häufig stark limitierte Effizienz der als Therapeutika eingesetzten Antikörper. Die moderate Tumorpenetration wird hauptsächlich durch die Größe der Antikörper und deren unerwünschte Aufnahme in die Zellen des retikuloendothelialen Systems über Fc-Rezeptoren verursacht [144]. Als ein Ausweg bot sich die Herstellung von möglichst kleinen Antikörper-Fragmenten, die noch die Bindungsspezifität für Antigene aufweisen. Im Jahre 1988 wurden die ersten Einzelkettenantikörper als das kleinste von einem Antikörper abgeleitete Antigen-bindende Fragment generiert [121, 137]. Die Einzelkettenantikörper zeigten zwar eine schnelle und effiziente Tumorlokalisierung und Verteilung innerhalb der Tumorgewebe [145], sie weisen jedoch im Vergleich zu intakten Antikörper-Molekülen gravierende Nachteile auf, wie den Verlust von Fc-abhängigen Effektorfunktionen und eine verkürzte Halbwertszeit [146]. Der Vorteil der Einzelkettenantikörper-Moleküle wird im Transport von Zell-toxischen Substanzen, wie Toxinen oder radioaktiven Isotopen ins Tumorgewebe gesehen. Eine weitere mögliche Verwendung besteht in der Transduktion von Einzelkettenantikörper-Genen in die Zellen, wo die Antikörper-Fragmente mit der Funktion essenzieller Proteine interferieren können. So zeigten Alvarez und Curiel [147] in einer Phase I Studie die Effizienz der Behandlung von Patientinnen mit Ovarialkarzinom mit einem für einen erbB-2-spezifischen Einzelkettenantikörper kodierendem Adenovirus. Durch eine spezifische Bindung des intrazellulär

exprimierten scFv-Fragments („*Intrabody*“) an das erbB-2 Antigen wurde die Translokation des Zielproteins vom endoplasmatischen Retikulum (ER) an die Zelloberfläche verhindert, was im Endeffekt zur Unterbrechung der Signalkaskade und zu der Apoptose der Zelle führte. Da das PSCA möglicherweise bei der Karzinogenese des Prostata Tumors eine Rolle spielt, könnte das „AMI“-Gen und das generierte „AMI“-Protein zur Inhibition des Tumorwachstums und der Metastasierung beitragen. Das „AMI“-Gen könnte mit Hilfe eines retroviralen Vektors stabil in die malignen Zellen transferiert werden. Gleichzeitig könnte der anti-PSCA Einzelkettenantikörper zur Pseudotypisierung der viralen Partikeln verwendet werden, um eine gezielte Transduktion der Prostatakarzinomzellen zu erreichen. Für die ER-Lokalisierung ist die Insertion eines ER-Retentionssignals am C-Terminus des Einzelkettenantikörpers notwendig. Durch die intrazelluläre Bindung vom „AMI“ an PSCA könnte dessen Oberflächenexpression und somit die Progression des Tumors verhindert werden (siehe S. 92).

4.7. Herstellung von löslichem PSCA (sPSCA)

Für die Bindungsanalysen und die Funktionalitätstests der chimären Rezeptoren wurde das PSCA in löslicher Form hergestellt. Dafür wurden humane HEK293-Zellen gewählt, um die Durchführung der posttranslationalen Modifikationen und somit die möglichst native Form des Proteins zu gewährleisten. Die Reinigung des rekombinanten Proteins erfolgte unter Verwendung der Ni^{2+} NTA Agarose und des am N-Terminus des Proteins angehängten His₆-Tags. Trotz einer effizienten Sekretion des Proteins in das Medium ergab die Reinigungsstrategie nur eine geringe Ausbeute. Der Grund dafür könnte eine durch multiple Glykosylierung des Proteins beeinträchtigte Zugänglichkeit des His₆-Tags und somit eine zu geringe Bindung des Proteins an die Ni^{2+} Ionen sein. Eine Verbesserungsmöglichkeit besteht hier in der Insertion eines Linkers zwischen den für PSCA kodierenden Bereich und den His₆-Tag. Das mittels einer Western Blot-Analyse detektierte rekombinante PSCA erschien in Form mehrerer Banden mit einem MW von ca. 25 bis 35 kDa als Resultat der multiplen Glykosylierungsstellen und des Anhängens des *c-myc* Epitops und dem His₆-Tag. Das rekombinante Protein konnte ausschließlich unter nicht reduzierenden Laufbedingungen mit dem 7F5 Antikörper nachgewiesen werden. Dies resultiert aus einer möglichen intramolekularen Ausbildung von Disulfid-

Bindungen, die zur Stabilisierung des Proteins führen. Die Formation dieser Art an kovalenten Brücken wurde durch eine Proteinsequenz-Analyse unter Einsatz von *ExPasy Proteomics Server* (Swiss Institute of Bioinformatics) bestätigt. Mittels des monoklonalen 7F5 Antikörpers konnten auch die nicht vollständig glykosylierten Proteine detektiert werden, was für die Glykosylierungs-unabhängige Formation des spezifischen Epitops spricht. Die mögliche physiologische Funktion der multiplen Glykosylierungen von PSCA ist bis jetzt nicht bekannt.

4.8. Generierung von chimären T-Zell-Rezeptoren

4.8.1. T-Zell-Rezeptor Beta-Kette als chimäres Konstrukt

Eine weitere potenzielle Anwendung von Einzelkettenantikörpern besteht in der Herstellung von membranständigen, chimären Rezeptoren, deren Bindungsspezifität dann durch die Antigen-bindende Domänen bestimmt wird. Dieser Ansatz erscheint besonders attraktiv, wenn zytotoxische T-Zellen in die adoptive Immuntherapie eingesetzt werden sollen, da hierbei die Probleme umgegangen werden können, die sich aus der reduzierten MHC-Klasse I-Expression auf Tumorzellen ergeben können. In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche chimäre Rezeptoren konstruiert, bei denen die variablen Domänen der α - und β -Ketten des T-Zell-Rezeptors gegen die eines Antikörpers ausgetauscht wurden [68, 148, 149, 150]. Die von Govermann et al. präsentierte Studie zeigte, dass die variablen V_H - und V_L - Domänen eines Antikörpers sowohl mit der $C\alpha$ - als auch mit der $C\beta$ - Domäne des T-Zell-Rezeptors als eine chimäre Kette und Bestandteil des TCR-CD3-Komplexes exprimiert werden [67]. Der Nachteil dieser Methode bestand in der Notwendigkeit der Doppeltransduktion der Zielzellen mit den beiden chimären Ketten.

Die zunächst versuchte Herstellung eines chimären AMI-BetaC2-Rezeptors hatte zum Ziel, T-Zell-Rezeptor-Ketten in ihrer natürlichen Umgebung im membranständigen TCR/CD3-Komplex zu modifizieren. Eine weitere Vorstellung war, dass die Überexpression an modifizierten β -Ketten durch die Konkurrenz um die α -Kette die Ausbildung der nativen T-Zell-Rezeptoren behindern könnte und damit unerwünschte Nebenwirkungen der aktivierten T-Zellen verhindern könnte. Aufgrund ihrer höheren Stabilität gegenüber der α -Kette wurde die konstante Domäne der β -Kette als der Bestandteil des chimären Rezeptors gewählt. Ein weiterer Vorteil wird

daran gesehen, dass die chimäre β -Kette zur Ausbildung von Homodimeren und von Heterodimeren mit der endogenen β -Kette unabhängig von der Assoziation mit einer α -Kette fähig ist [67]. Basierend auf diesen Erkenntnissen lässt sich feststellen, dass die Expression eines funktionellen Rezeptor-CD3-Komplexes auch unter Verwendung von zwei chimären β -Ketten, erfolgen kann. Die C β -Domäne war für die Bildung der *hinge* Region zwischen der Antigen-bindenden- und der Transmembrandomäne des Rezeptors vorgesehen. Diese vergrößerte den Abstand des scFv zur Zellmembran und erschien für eine effiziente Antigenbindung des chimären Rezeptors von Vorteil. Die Bedeutung der *hinge* Region wurde von mehreren Autoren durch einen direkten Vergleich von chimären Rezeptoren mit unterschiedlich langen und von verschiedenen Molekülen abgeleiteten Domänen untersucht [151, 152]. Diese Studien bestätigten die Rolle der *hinge* Region nicht nur für die Antigenbindung, sondern auch für die stabile Expression des chimären Rezeptors sowie für dessen Stabilität und Funktionalität bei der T-Zell-Aktivierung. Fusionsproteine ohne *hinge* Region waren nicht funktionell. Als *hinge* Region, die zur Expression von funktionellen Rezeptoren führten, wurden verschiedene Moleküle bereits eingesetzt z.B. die Ig-ähnliche Domäne des CD8 α -Moleküls [73], die *hinge* C H_2 -C H_3 -Region des CD4-Moleküls [153], oder die C H_2 - und C H_3 -Domänen eines IgG-Moleküls [154]. Die Funktionalität dieser chimären Rezeptoren wurde in mehreren Ansätzen demonstriert.

Die Protein-Expression des chimären AMI-BetaC2-Rezeptors wurde zuerst in den HEK293-Zellen gezeigt. Die ausschließlich intrazellulär detektierte Lokalisierung des chimären Rezeptors ist auf das Fehlen des CD3-Komplexes in der Zelllinie zurückzuführen, der für eine stabile Oberflächenexpression des TCR/CD3-Komplexes notwendig ist. Da in den HEK293-Zellen keiner der notwendigen Assoziationspartner für die chimäre AMI-BetaC-Kette zur Verfügung stand, wurde sie im ER akkumuliert. Eine entscheidende Rolle bei der Assoziation der β -Kette mit dem CD3-Komplex und dadurch bei Stabilisierung des TCR/CD3-Komplexes wird den in der Transmembrandomäne der Beta-Kette vorkommenden positiv geladenen Aminosäuren (Lysin) und deren Wechselwirkung mit den negativ geladenen Aminosäuren (Asparaginsäure) in den Transmembrandomänen der δ -, ϵ - und γ -Polypeptidketten zugeschrieben [155]. Im endoplasmatischen Retikulum findet sowohl der Zusammenbau des TCR-CD3-Komplexes als auch die Retention und eine schnelle proteolytische Degradation der nicht assemblierten α -, β - und CD3 δ -

Ketten statt [156, 157, 158]. Die restlichen CD3 γ -, ϵ - und ζ -Moleküle werden im ER zurückgehalten und erst in den Lysosomen abgebaut [158, 159, 160]. Bei der Untersuchung der Beta Kette des TCR konnte in der Transmembrandomäne des Proteins eine dominante Sequenz für einen proteolytischen Abbau identifiziert werden [161]. Bonifacino et al. untersuchten die Mechanismen, die zu einer Retention der Beta-Kette im ER führen könnten [162]. In dieser Studie wurde die Bedeutung der geladenen Aminosäuren in der Transmembrandomäne für die Zurückhaltung des Proteins im ER bei der Abwesenheit von CD3-Komplex belegt. Eine andere Gruppe identifizierte eine aus fünf Aminosäuren bestehende, zytoplasmatisch lokalisierte Sequenz, die als ER-Retentions-Motiv fungieren soll [163]. Die Assoziation mit den restlichen Komponenten des TCR-CD3-Komplexes führt zur Maskierung der Transmembrandomäne der Beta Kette, wodurch die ER-Retention und der proteolytische Abbau des Proteins aufgehoben werden.

Um die Oberflächenexpression zu untersuchen, wurde eine T-Zelllinie mit dem chimären AMI-BetaC2-Rezeptor modifiziert. Durch die Expression der chimären β -Kette in einer T-Zelllinie sollten die natürlichen Komponenten des TCR-CD3-Komplexes als Voraussetzung für eine effiziente Komplexbildung und Oberflächenexpression des chimären Proteins zur Verfügung stehen. Um die Detektion der chimären Kette einfacher zu gestalten, wurde eine β -Ketten-defiziente Mutante der Jurkat-Zellen (J.RT3-T3.5) als Zielzelllinie eingesetzt. Unter Verwendung dieser Zelllinie wurden bereits Versuche zur Rekonstruktion eines aktiven TCR-CD3-Komplexes mittels Gentransfers verschiedener β -Kette- Konstrukte durchgeführt [164, 165, 166]. Die Modifizierung der Zellen erfolgte mittels des retroviralen, auf dem „*Moloney murine leukaemia virus*“-basierenden Systems nach einem für eine effiziente Transduktion der T-Zellen publizierten Protokoll [167]. Trotz einer hohen Transduktionsrate von über 90% konnte nur eine sehr schwache und instabile Oberflächenexpression der chimären AMI-BetaC-Kette detektiert werden. Ebenfalls ließ sich kein CD3-Komplex auf der Zelloberfläche nachweisen. Eine denkbare Ursache für die nicht eingetretene Komplexbildung zwischen der intrazellulär stark exprimierten chimären Kette und dem CD3-Komplex wäre ein zu niedriger Expressionslevel der endogenen Assoziationspartner. Mit Hilfe der intrazellulären Färbearanalysen mit den gegen die ϵ -Kette des CD3-Komplexes und die konstante Domäne der α -Kette gerichteten Antikörpern, konnte dies als möglicher Grund

ausgeschlossen werden. Durch eine zusätzliche Transduktion von CD3⁺-Jurkat wt Zellen mit dem chimären Konstrukt sollten Ursachen, die auf mögliche Mutationen des TRC-CD3-Expressionssystems in den J.RT3-T3.5-Zellen zurückzuführen wären, ausgeschlossen werden. Mittels einer Oberflächenexpressionsanalyse mit dem anti-scFv konnte dennoch kein chimärer Rezeptor nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung für deren intrazelluläre Expression und Akkumulation ist die beeinträchtigte Assoziation mit den endogenen Komponenten aufgrund der Konformationsänderungen des chimären Proteins durch N-terminale Insertion des Einzelkettenantikörpers. Für die essenzielle Rolle der Assoziation für die Stabilisierung des chimären Proteins spricht die moderate und transiente Oberflächenexpression des chimären AMI-BetaC-Rezeptors in der Abwesenheit des CD3-Komplexes auf den transduzierten J.RT3-T3.5-Zellen.

Eine weitere Erklärung für die schwache CD3-unabhängige Expression des chimären Rezeptors an der Zelloberfläche wäre die mögliche alternative GPI-Verankerung des Proteins. Innerhalb der Transmembrandomäne der Beta-Kette konnte eine Signalsequenz für die GPI-Verankerung identifiziert werden [168]. Eine TCR α -CD3-unabhängige Expression von GPI-verankerten Beta-Ketten auf der Oberfläche von TCR- β -transgenen SCID (schwerer kombinierter Immundefekt)-Mäusen abgeleiteten Thymozyten ist bereits beschrieben worden [169]. Eine funktionelle Signifikanz der GPI-verankerten Beta-Kette des T-Zell-Rezeptors konnte bisher nicht geklärt werden.

4.8.2. Chimärer, auf der CD3 ζ -Kette-basierender T-Zell-Rezeptor

Angesichts der Problematik, die sich bei der Assoziation der chimären AMI-BetaC2 Kette mit dem endogenen TCR-CD3-Komplex feststellen ließ, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein neuer, mit der CD3 ζ -Kette modifizierter Rezeptor konstruiert. Die CD3 ζ -Kette und die Fc ϵ RI γ -Kette werden bevorzugt bei der Generierung von chimären Rezeptoren aufgrund ihrer Eigenschaften als Signaltransduktionskette verwendet. Beide Moleküle werden als Bestandteile von multimeren Rezeptorkomplexen exprimiert und enthalten intrazellulär die ITAM-Sequenzen, die nach der Rezeptor-Kreuzvernetzung phosphoryliert werden, wodurch eine Signalkaskade aktiviert wird [170, 171].

Die Überlegenheit der Modifizierung der Zellen mit einer scFv ζ -Kette wurde in einer Studie von Haynes et al. präsentiert [80]. Trotz einer äquivalenten Expression der

scFv- ζ und scFv- Fc ϵ RI γ in den primären T Zellen, führte die über die scFv- ζ -Kette-vermittelte Aktivierung zu einer effizienteren Zytokinsekretion und Zytotoxizität als die über die scFv- Fc ϵ RI γ -Kette. Eine zusätzlich durchgeführte *in vivo* Studie demonstrierte die überlegene Effizienz der scFv- ζ -Kette hinsichtlich der Tumoreliminierung. Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung von CD3 ζ -Kette besteht in deren essenziellen Rolle bei der Assemblierung und Stabilisierung des TCR-CD3-Komplexes [172, 173]. CD3 ζ -defiziente Mäuse zeigen eine verringerte Anzahl an Thymozyten mit einem reduzierten TCR-Expressionslevel [174]. Die endogene CD3 ζ -Kette wird entweder als Homodimer (32 kDa) oder als Heterodimer ζ - η (38 kDa) exprimiert [175]. Um die Formation der dimeren Form und somit die Erhaltung der nativen Assoziationseigenschaften zu gewährleisten, wurden für die Konstruktion der AMI-BetaC-CD3 ζ -Kette nicht nur die Transmembrandomäne und die intrazelluläre Domäne, sondern auch ein Teil der extrazellulären Domäne der Zeta-Kette verwendet. Der extrazelluläre Anteil der konstanten β -Domäne diente dabei als *hinge* Region, die für eine stabile und funktionelle Expression eines CD3 ζ -basierenden Rezeptors als Bestandteil des TCR-CD3-Komplexes erforderlich ist [151]. Da diese Art chimärer Rezeptoren auch TCR-CD3-unabhängig auf der Zelloberfläche exprimiert werden kann [176], wurden für die ersten Oberflächenexpressionsanalysen die transfizierten CD3⁻ HEK293-Zellen herangezogen. Mittels der gegen die C β -Domäne und den scFv AMI-gerichteten Antikörper konnte eine stabile hohe CD3-unabhängige Oberflächenexpression des chimären Rezeptors nachgewiesen werden.

Tumor-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten haben auf ihrer Oberfläche eine hohe Dichte von Antigenrezeptoren, mit denen sie jeweils ein bestimmtes Tumor-assoziiertes Peptid gebunden an ein MHC-Molekül auf der Oberfläche der Tumorzellen erkennen. Die Frequenz eines einzelnen Peptid-MHC-Komplexes auf der Tumorzelle ist jedoch gering und die Affinität der T-Zell-Rezeptoren für einen Peptid-MHC-Komplex ist niedrig. Da T-Lymphozyten für ihre Aktivierung eine minimale Anzahl von Interaktionen zwischen Rezeptor und dem Antigen benötigen (bis 2000) [177], die durch das „serial triggering“ in der immunologischen Synapse erreicht wird, dauert es eine gewisse Zeit bis eine T-Zelle nach Kontakt mit einer Tumorzelle aktiviert wird. Man diskutiert Zeiten von mehreren Stunden [178]. Durch die Expression von chimären Rezeptoren mit hoher Bindungsaffinität auf den T-Lymphozyten und aufgrund der vergleichsweise hohen Dichte des Zielantigens auf

den Tumorzellen kann man erwarten, dass die Aktivierungszeit der modifizierten T-Lymphozyten stark reduziert wird. Die erhöhte Effizienz der T-Zell-Aktivierung könnte zusammen mit der Möglichkeit zur Armierung einer großen Zahl von polyklonalen T-Zellen mit einer Tumor-spezifischen Erkennungsstruktur als der entscheidende Vorteil dieser Therapieform angesehen werden.

Unter Verwendung von transduzierten CD3⁺ Jurkat Zellen und mittels einer nativen Oberflächenfärbung mit dem gereinigten PSCA konnte die Bildung eines für die in den Membranmikrodomänen („*lipid-rafts*“) lokalisierten Proteinen typischen Fleckenmusters („*patches*“) beobachtet werden. Die Bildung des punktierten Musters wird auf die Liganden-induzierte Kreuzvernetzung zurückgeführt. Ähnlich führte die native Färbung mit dem anti-scFv Antikörper zur Aggregatbildung, die durch die Kreuzvernetzung der chimären Rezeptoren durch den bivalenten Antikörper zustande kommt. Dieses Phänomen wurde bereits für zahlreiche membranständige Rezeptoren beschrieben [179, 180]. Die Aggregation spielt eine essenzielle Rolle bei der Aktivierung der Signaltransduktionsketten [181, 182]. Aus der durch eine bivalente Bindung der Liganden hervorgerufenen Kreuzvernetzung von Rezeptoren resultiert eine Kreuz-Phosphorylierung der Tyrosin-Kinasen, die mit dem TCR-CD3-Komplex assoziiert sind. Dies konnte auch unter Verwendung von chimären ζ -Ketten beobachtet werden [69, 183].

4.9. Kostimulatorischer AMI-CD28-Rezeptor

Da ein Großteil der T-Lymphozyten, der für die Armierung mit den chimären Rezeptoren aus dem Blut rekrutiert wird, nicht aktiviert ist, ist davon auszugehen, dass nach dem „Zwei-Signal-Modell“ für eine effiziente Aktivierung ein zweites kostimulatorisches Signal benötigt wird [184]. Wie bereits experimentell in einem Mausmodell bewiesen, führt das Signal über einen chimären CD3 ζ -Rezeptor nur zur unvollständigen Aktivierung und somit zur Anergie der T-Zellen [185]. Die Aufrechterhaltung der kostimulatorischen Signale scheint daher essenziell zur Vermeidung der Aktivierungs-induzierten Anergie bzw. Apoptose der Zellen beizutragen. So könnte zum Beispiel die inhibitorische Wirkung des auf aktivierten T-Zellen exprimierten CTLA-4-Rezeptors unterspielt werden, der wesentlich höhere Affinität zu dem natürlichen B7-Liganden als das CD28-Molekül hat und daher bei

der Aktivierung von Antigen-reaktiven T-Zellen eine wichtige Rolle spielt [186]. In einer Studie von Finney et al. wurden verschiedene kostimulatorische Moleküle wie CD28, ICOS, CD134 und CD137 als Bestandteile eines chimären CD3 ζ -Rezeptors hinsichtlich ihres Aktivierungspotentials untersucht [187]. Die Überlegenheit des CD28-basierenden Rezeptors bestand in einer wesentlich effizienteren Produktion von IL2, das eine essenzielle Rolle für die vollständige Aktivierung der T-Zellen und deren Proliferation spielt. Wie bereits untersucht, wird durch Bindung eines Antigens an den chimären CD28-Rezeptor ein Signal generiert, das identisch dem nativen CD28-Signal ist [87].

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde für eine vollständige Aktivierung der PSCA-spezifischen chimären T-Zellen ein zusätzlicher CD28-basierender Rezeptor generiert. Um die kostimulatorische und synergistische Wirkung zu erzielen, wurde das CD28-Molekül N-terminal mit dem scFv „AMI“ modifiziert. Da das CD28-Protein ohne akzessorische Moleküle neben der dimeren Form auch als Monomer auf der Zelloberfläche exprimiert wird [188], wurde der chimäre AMI-CD28-Rezeptor sowohl auf der Oberfläche einer Zelllinie mit nicht lymphoidem Ursprung (HEK293), als auch auf der Oberfläche der Jurkat-Zellen nachgewiesen. Die Tauglichkeit der chimären Kette als Rezeptor wurde zuerst durch eine Bindungsanalyse des gereinigten nativen Antigens PSCA bestätigt. Um die Bindungsspezifität zu untersuchen, wurde die CD28⁻ Zelllinie J.RT3.T3.5 mit dem Konstrukt transduziert und anschließend einer Doppelfärbungsanalyse mit löslichem PSCA und dem anti-CD28 Antikörper unterzogen. Die eindeutige Kolo-kalisierung des gebundenen Antigens mit dem CD28-Molekül bewies die Bindung vom PSCA ausschließlich an die stark exprimierte chimäre AMI-CD28 Kette. Ähnlich wie bei den Färbearbeiten zur Detektion der chimären AMI-BetaC-CD3 ζ -Kette kommt es durch die Kreuzvernetzung des AMI-CD28 Rezeptors durch das Antigen oder den anti-CD28 Antikörper zur Aggregatbildung, was typisch für verschiedene signalvermittelnde Rezeptoren ist. Die beobachtete Analogie in den Färbemustern der chimären AMI-BetaC-CD3 ζ - und AMI-CD28-Rezeptoren ist erklärbar durch die Expression des kostimulatorischen Moleküls in der Nähe des T-Zell-Rezeptors als wichtiger Bestandteil des zentralen Bereiches („*supramolecular activation cluster*“) einer immunologischen Synapse [177, 189]. Durch die Expression der CD28-Moleküle innerhalb der Membranmikrodomänen („*lipid rafts*“) kann es nach der Aktivierung über diesen kostimulatorischen Rezeptor zur Rekrutierung von Signalmolekülen wie LAT und

p56^{lck} in die Nähe des T-Zell-Rezeptors kommen, was für die Ausbildung einer immunologischen Synapse eine essenzielle Rolle spielt [190, 191]. Zahlreiche Studien mit CD28-defizienten Mäusen bestätigten die Signifikanz des CD28-Moleküls für eine anhaltende T-Zell-Antwort [192] sowie für die Reduktion der für eine effiziente T-Zell-Aktivierung erforderlichen Antigenkonzentration [193]. Die kostimulatorische Wirkung dieses Moleküls ist hauptsächlich auf die Steigerung der Transkriptionsrate des IL2-Gens und die Erhöhung der Stabilität der IL2-mRNA zurückzuführen [194, 195]. Die von Diehn et al. durchgeführte Microarray-Analyse bestätigte die kostimulatorische Auswirkung des CD28-Moleküls auf die Expression der Gene, die über den T-Zell-Rezeptor induziert werden [196]. Insgesamt resultieren die ausgelösten Signalkaskaden in der effizienten T-Zell-Aktivierung, wobei für das Zusammenspiel der beiden Rezeptoren verschiedene Modelle vorgestellt wurden [196, 197, 198]. Das kostimulatorische Signal trägt zusätzlich durch die Erhöhung der Expression des anti-apoptotischen Proteins BCL-X zum Überleben der Zellen bei [199].

4.10. Funktionalität der chimären AMI-Rezeptoren

Eine mögliche Anwendung von chimären Ketten als Erkennungsstruktur zur Armierung von zytotoxischen T-Lymphozyten hängt hauptsächlich von deren Funktionalität als Signal-vermittelter Rezeptor ab. Die chimäre AMI-BetaC-CD3 ζ -Kette wurde daher hinsichtlich ihres Assoziationsverhaltens und ihres Aktivierungspotentials in einer Western Blot-Analyse untersucht. Die Fusion der Zeta-Kette mit dem scFv und der extrazellulären konstanten Beta Domäne führte zur Generierung eines Proteins mit einem MW von ca. 70 kDa. Neben der monomeren Form des Proteins wurde sowohl eine Homodimerenbildung mit einem MW von ca. 140 kDa als auch eine Heterodimerenbildung mit der endogenen ζ -Kette (MW von ca. 85 kDa) detektiert. Die beobachtete Dimerenformation ist auf den bei der Generierung des Rezeptors übernommenen extrazellulären Anteil der Zeta-Kette mit dem Cystein-Rest zurückzuführen. Dadurch sollten die natürlichen Assoziationseigenschaften des Proteins mit den endogenen Polypeptidketten des CD3-Komplexes erhalten bleiben. Die eindeutig bevorzugte Assoziation der chimären Kette mit der endogenen ζ -Kette ist wahrscheinlich auf die sterischen Hinderungen, die bei der Homodimerbildung entstehen könnten, zurückzuführen.

Um die Funktionalität des chimären AMI-BetaC-CD3 ζ -Rezeptors zu untersuchen wurden die transduzierten Jurkat-Zellen entweder mit dem anti-CD3 Ak oder mit dem löslichen PSCA stimuliert. Da die Phosphorylierung der Tyrosin-Reste innerhalb der ITAM-Sequenzen des CD3-Komplexes zu den frühen Signaltransduktionsschritten gehört, wurden die stimulierten Zellen hinsichtlich der Phosphorylierung der ζ -Kette unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers analysiert [106]. Die Stimulation der Zellen mit dem löslichen Antigen führte zur Phosphorylierung der heterodimeren Form der chimären Kette assoziiert mit der endogenen ζ -Kette. Da die als Homodimer oder Monomer nachgewiesenen Rezeptoren hingegen unphosphoryliert blieben, scheint die Assoziation der chimären mit der endogenen ζ -Kette für die Fähigkeit zur Signalübertragung eine essenzielle Rolle zu spielen. Dies wurde zusätzlich durch die Aktivierungsstudie unter Verwendung des monoklonalen anti-CD3 Antikörpers bestätigt. Die Kreuzvernetzung der Rezeptoren führte nicht nur zur Phosphorylierung der endogenen ζ -Ketten, sondern auch des Heterodimers mit der chimären AMI-BetaC-CD3 ζ -Kette. Angesichts dieser Ergebnisse läßt sich vermuten, dass es durch Heterodimerbildung der chimären mit den endogenen ζ -Kette zur Assoziation mit dem CD3-Komplex kommt.

Die Funktionalität der bereits publizierten ζ -Kette-basierenden chimären Rezeptoren wurde durch *in vitro* Untersuchungen hinsichtlich der Zytokinsekretion, der Zytotoxizität und der Proliferation der Zellen als Ergebnis einer Antigenstimulation gezeigt [71, 77, 200]. Die *in vivo* Reaktivität der chimären ζ -Rezeptor-T-Zellen wurde zum ersten Mal 1994 von Moritz et al. überprüft [73]. Durch die Behandlung von Tumor-tragenden Mäusen mit den modifizierten T-Zellen konnte eine Tumorkolonialisierung der Effektorzellen verbunden mit der Verlangsamung des Tumorstwachstums erzielt werden. In einer anderen Studie konnte bereits eine vollständige Tumorrepression als Ergebnis eines adoptiven T-Zelltransfers beobachtet werden [201]. Bis jetzt sind keine klinischen Studien über den Einsatz modifizierter T-Zellen als adjuvante Immuntherapie zur Behandlung von Tumorerkrankungen publiziert worden.

Ähnlich wie bei den T-Zell-basierenden klinischen Studien hängt der Erfolg dieser Immuntherapie hauptsächlich von der Persistenz und dem Überlebenspotenzial der transferierten T-Zellen ab. Die vollständige Aktivierung, die zu einer effizienten Proliferation der T-Zellen führen würde, ist dabei eine wesentliche Voraussetzung. Da das Signal über einen chimären ζ -Kette-basierenden Rezeptor allein nicht

ausreichend für eine vollständige Aktivierung von peripheren T-Zellen ist [202], kann die Assoziation des chimären Rezeptors mit dem endogenen CD3-Komplex eine Möglichkeit zur Verbesserung des Aktivierungspotenzials der Zellen darstellen. Der native TCR-CD3 Komplex enthält intrazellulär insgesamt zehn ITAM-Sequenzen, die nach der Stimulation phosphoryliert werden und dadurch quantitativ unterschiedliche Signale induzieren können [203]. Die Expression der chimären Rezeptoren als Bestandteil eines nativen TCR/CD3-Komplexes wird wahrscheinlich zu einer vollständigen Aktivierung der modifizierten T Zellen wesentlich beitragen.

Eine besondere Eigenschaft der ζ -Kette stellt deren Herunterregulation und beeinträchtigte TCR-Funktion in den betroffenen T-Zellen dar [204]. Dieses Phänomen wurde bei vielen Tumorarten wie z.B. Prostatakarzinom [205], Kolonkarzinom [206] und Melanom [207] festgestellt. Die reduzierte Expression der ζ -Kette ist wahrscheinlich auf die Einwirkung von Faktoren, die von den malignen Zellen sekretiert werden, zurückzuführen [208]. Durch den Transfer der chimären ζ -Kette könnte möglicherweise die Regenerierung der TCR-Expression und somit des Aktivierungspotenzials der modifizierten T-Zellen erfolgen.

Der für eine vollständige Aktivierung und somit für eine anhaltende Proliferation der modifizierten PSCA-spezifischen T-Lymphozyten generierte AMI-CD28-Rezeptor wurde ebenfalls hinsichtlich seines Assoziationsverhaltens und seiner Funktionalität untersucht. Die unter nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführte Western Blot-Analyse ermöglichte die Detektion der chimären AMI-CD28-Kette sowohl als Monomer als auch als Homodimer und Heterodimer mit dem endogenen CD28-Molekül. Durch die Verwendung des gesamten CD28-Moleküls als Bestandteil der chimären Kette sind die nativen Assoziationseigenschaften des Rezeptors erhalten geblieben. Um die Funktionalität des chimären AMI-CD28-Rezeptors zu untersuchen wurden die transduzierten Zellen mit den an der Plastikoberfläche immobilisierten PSCA bzw. anti-CD28 Antikörper stimuliert. Das Aktivierungspotenzial des chimären AMI-CD28-Rezeptors wurde mittels Detektion der aktivierten Akt-Kinase, deren Phosphorylierung zu frühen Schritten der Signaltransduktionskaskade gehört, untersucht. Der Akt-Kinase wird eine wesentliche Rolle bei der Regulation des Gleichgewichtes zwischen dem Überleben und der Apoptose in der Zelle zugeschrieben [104] und sie stellt ein wichtiges Effektormolekül für die über den CD28-Rezeptor aktivierte Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) dar [209]. Die Stimulation

der transduzierten Zellen mit löslichem PSCA resultierte in einer Phosphorylierung der Akt-Kinase in den AMI-CD28 modifizierten Zellen. In den als negative Kontrolle mitgeführten Jurkat LV-Zellen blieb hingegen die Akt-Kinase in der inaktiven Form. Der durch PSCA ausgelöste Phosphorylierungslevel der Akt-Kinase war vergleichbar mit dem, der durch den anti-CD28 Antikörper induziert wurde. Ähnlich wie in jüngst veröffentlichten *in vitro* [210] und *in vivo* Studien [75] soll durch das Zusammenspiel der beiden chimären Rezeptoren AMI-BetaC-CD3 ζ und AMI-CD28 eine anhaltende Proliferation der Zellen verbunden mit einer effizienten Zytokinsekretion und Zytotoxizität erreicht werden. Die kürzlich veröffentlichten klinischen Studien über den Einsatz von mit chimären ζ -Ketten-Rezeptoren modifizierten T-Zellen zur Behandlung von HIV-Patienten veranschaulichten die Notwendigkeit der Kostimulation der Zellen für eine effiziente Induktion der T-Zell-Aktivierung und für die anhaltende Persistenz der Effektorzellen im Organismus [211].

4.11. Ausblick: Zytotoxische Aktivität und anhaltende Proliferation als Ergebnis der Modifizierung der humanen T Zellen mit chimären Rezeptoren

Die im Rahmen dieser Arbeit generierte AMI-BetaC-CD3 ζ -Kette soll hinsichtlich ihrer Assoziation mit dem endogenen CD3-Komplex genauer charakterisiert werden. Dies kann in Form einer „*capping*“-Immunfluoreszenzanalyse mit dem Cy3-markierten anti-scFv und dem FITC-markierten anti-CD3 Antikörper durchgeführt werden. Die Überlagerung der beiden Fluoreszenzfarbstoffe innerhalb der durch Rezeptoraggregation entstehenden Kappen spricht für eine Komplexbildung zwischen dem chimären und dem endogenen Rezeptor.

Um das Aktivierungspotenzial der in dieser Arbeit generierten chimären AMI-BetaC-CD3 ζ - und AMI-CD28-Rezeptoren in einem adäquaten System analysieren zu können, ist es notwendig, periphere T-Lymphozyten mit den beiden Konstrukten mittels eines retroviralen Transfers zu modifizieren. Für die Transduktion mit den auf „*Moloney Murine Leukemia Virus*“-basierenden Replikations-inkompetenten retroviralen Partikeln ist es erforderlich, die aus dem peripheren Blut isolierten CD3⁺T-Zellen zuerst durch Stimulation mit einem Mitogen zur Proliferation zu bringen. Um die Transduktion effizient zu gestalten, werden unterschiedliche Optimierungen durchgeführt. Die VSV-G-pseudotypisierten retroviralen Partikel können durch Ultrazentrifugation der viralen Überstände stark konzentriert werden und dadurch für die Transduktion mit hohem Titer und hohem MOI-Wert („*multiplicity of infection*“) eingesetzt werden. Durch die Beschichtung der Kulturplatten mit dem Fibronectinfragment CH-296 wird eine Kolokalisierung der Retroviren und der Zielzellen erreicht, wodurch die Effektivität des Gentransfers zusätzlich erhöht werden kann [212]. Die über die anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper aktivierten T Zellen werden nach einer Ko-Transduktion auf die Sekretion von Zytokinen wie IL2, IFN γ und TNF α hin mit einem ELISA-Test untersucht. Ihre zytotoxische Aktivität gegenüber PSCA-positiver Tumorzellen wird in einem Chromium-Freisetzungstest analysiert. Für die therapeutische Wirksamkeit der modifizierten T-Zellen ist ihre anhaltende Proliferation und langzeitige Persistenz *in vivo* von essenzieller Bedeutung. Die kontinuierliche Ko-Stimulation bei Kontakt mit Tumorantigen und die Vermeidung der inhibitorischer Signale über CTLA-4 kann hier als wichtiger Vorteil

der Armierung von T-Zellen mit chimären Rezeptoren angesehen werden. Um das Potenzial der zur primären Aktivierung naiver T-Zellen generierten chimären Rezeptoren zu demonstrieren, sollen die Konstrukte in Form eines lentiviralen Gentransfers in die T-Zellen eingeführt werden. Da die Lentiviren sich durch die Fähigkeit zur Infektion von Zellen in der G0-Phase auszeichnen, kann eine durch den Thymidineinbau ermittelte Proliferation der T-Zellen nach Kontakt mit PSCA ausschließlich auf diese spezifische Interaktion zurückgeführt werden. Durch eine systematische Stimulation der modifizierten T-Zellen mit dem Antigen soll die Generierung einer Langzeitkultur und die selektive Expansion der modifizierten T-Zellen ermöglicht werden.

Die klinische Relevanz der chimären T-Zellen wird in einem Mausmodell mit humanen Prostatakarzinom-Xenograft etabliert. Die Wirksamkeit der Zellen wird anhand der Kriterien wie *in vivo*-Persistenz mit Tumorlokalisierung der verabreichten T-Zellen und die Regression des etablierten Tumors mit Inhibierung der Metastasenbildung beurteilt.

5. Zusammenfassung

Die Effizienz einer Tumorthherapie durch einen Transfer von *ex vivo* aktivierten Tumor-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten wird durch zahlreiche Faktoren wie geringe Anzahl der isolierten spezifischen T-Zellen, schnelles Abklingen der Aktivität und kurzzeitige Persistenz der transferierten Effektorzellen im Empfängerorganismus stark limitiert. Eine potenzielle Möglichkeit zur Überwindung dieser Einschränkungen bietet die Entwicklung einer neuen Strategie zur Armierung der zytotoxischen T-Lymphozyten mit Tumor-spezifischen chimären Rezeptoren. Dabei werden die Vorteile des hohen zytotoxischen Potenzials von T-Effektorzellen mit den Vorzügen einer MHC-unabhängigen Antigenerkennung durch Antikörper kombiniert. Ziel dieser Arbeit war es, die Grundlagen für eine solche immuntherapeutische Strategie zu erarbeiten. Da das Prostatakarzinom die am meisten diagnostizierte maligne Erkrankung und die dritt häufigste Todesursache des Mannes ist, wurde das auf der Oberfläche von Prostatakarzinomzellen exprimierte PSCA (prostataspezifisches Stammzell Antigen) als Zielantigen gewählt. Im Fall des primären, organbegrenzten Erkrankungsstadiums stellen die radikale Prostatektomie und die Strahlentherapie die Methoden der Wahl dar. Die Behandlung von Patienten im fortgeschrittenen metastasierenden Tumorstadium erfolgt meistens in Form einer Androgenablation (Hormontherapie). Während der Antiandrogen-Behandlung oder der Tumorprogression kommt es zur Entstehung von hormonrefraktären Tumorzellen, die sich somit der Therapie entziehen können. Neben diesen therapierefraktären Spätstadien des Prostatakarzinoms bedürfen auch die früh entstehenden Mikrometastasen (minimale Resterkrankung) einer neuen adjuvanten Behandlungsoption. Der Erfolg einer solchen Immuntherapie hängt maßgeblich von der Auswahl eines geeigneten tumorassoziierten Zielantigens ab. Das prostataspezifische Stammzell Antigen (PSCA) ist ein membranständiges Tumor-assoziiertes Antigen, das in mehr als 80 % der primären Prostatakarzinome überexprimiert wird. PSCA wird als besonders aussichtsreiches Zielantigen einer Immuntherapie bei fortgeschrittenen Prostatakarzinomen angesehen, weil sein Expressionsniveau mit der Tumorprogression und der Entwicklung zum androgenunabhängigen Wachstum ansteigt.

In der vorgelegten Arbeit wurde zunächst durch Immunisierung von Mäusen mit PSCA-transfizierten P815-Maus-Mastozytomzellen ein neuer monoklonaler PSCA-

spezifischer Antikörper generiert, der als Grundlage für die Konstruktion eines Einzelkettenantikörpers verwendet wurde. Aus dem 7F5 Hybridomklon, der sich durch sehr hohe Bindungsstärke auszeichnete, wurden mittels degenerierter Primer die kodierenden Sequenzen für die variablen V_H und V_L Domänen des Antikörpers amplifiziert. Die unter Verwendung der *IgBlast* Datenbank durchgeführte Sequenzanalyse bestätigte die Zugehörigkeit der isolierten Ketten zu bereits bekannten murinen Immunglobulin-Subgruppen. Durch die Verbindung der beiden V_H und V_L Domänen mittels eines (Gly₄Ser₁)₃-Linkers wurde der PSCA-spezifische Einzelkettenantikörper „AMI“ generiert. Für die ersten Untersuchungen der Bindungseigenschaften wurde der Einzelkettenantikörper in löslicher Form durch die heterologe Genexpression in HEK293-Zellen hergestellt und aufgereinigt. Die mit gereinigtem „AMI“ durchgeführten Bindungsanalysen bestätigten die Funktionalität des rekombinanten Proteins und seine Anwendbarkeit zur Chimerisierung eines membranständigen Rezeptors. Trotz der im Vergleich zu parentalem 7F5 Antikörper verringerten Bindungsstärke, die durch nur noch monovalente Bindung verursacht wird, band „AMI“ effizient an das membranständige PSCA. Parallel wurde das PSCA als lösliches, mit einem *c-myc*-Epitop und His₆-Tag versehenes Protein für die geplanten Bindungs- und Aktivierungsstudien mit chimären Rezeptoren unter Verwendung von HEK293-Zellen hergestellt.

Nach dem „Zwei-Signal-Modell“ benötigen T-Zellen für eine effiziente Antigen-spezifische Aktivierung neben dem T-Zell-Rezeptorsignal ein zusätzliches kostimulatorisches Signal. Daher wurden chimäre Rezeptoren auf der Basis der Beta-Kette des T-Zell-Rezeptors und des CD28-Moleküls generiert. Die Modifizierung der T-Zelllinie erfolgte mittels eines retroviralen „*Moloney murine leukaemia virus*“-basierenden Gentransfers. Der zuerst generierte AMI-BetaC-Rezeptor konnte ausschließlich intrazellulär detektiert werden, was möglicherweise durch eine beeinträchtigte Assoziation der chimären Kette mit den endogenen Molekülen des TCR-CD3-Komplexes verursacht wurde. Um die Assoziationseigenschaften und somit die Oberflächenexpression der chimären Kette zu optimieren, wurden die gesamten Transmembrandomäne und die intrazellulären Domänen der Beta-Kette gegen die der CD3 ζ -Kette getauscht. Neben einer starken Oberflächenexpression des chimären AMI-BetaC-CD3 ζ -Rezeptors wurde auch die effiziente Bindung von löslichem PSCA nachgewiesen. Mittels einer Western Blot-Analyse konnte die Bildung von Homodimeren und von Heterodimeren mit der endogenen ζ -Kette

demonstriert werden. Für die Aktivierungsassays wurden die Zellen einmal mit löslichem PSCA, bzw. zum anderen mit einem anti-CD3 Antikörper stimuliert, die beide auf der Plastikoberfläche immobilisiert wurden. Die Bindung des Rezeptors an das spezifische Antigen führte zur Phosphorylierung der ITAM-Sequenzen der heterodimeren ζ -Kette, was die Funktionalität des chimären Rezeptors bestätigte. Die polyklonale Stimulation der Zellen über den anti-CD3 Antikörper resultierte ebenfalls in der Phosphorylierung der heterodimeren ζ -Kette, was ein Hinweis auf eine mögliche Interaktion der chimären Kette mit dem endogenen CD3-Komplex lieferte.

Um die Aktivierungs-induzierte Anergie bzw. Apoptose der unvollständig aktivierten T-Zellen zu vermeiden ist neben dem ersten Signal über den chimären T-Zell-Rezeptor ein zweites Signal über ein kostimulatorisches Molekül wie z. B. den CD28-Rezeptor nötig. Um die kostimulatorische und synergistische Wirkung über das selbe Antigen zu erzielen, wurde das CD28 Molekül N-terminal ebenfalls mit dem Einzelkettenantikörper „AMI“ modifiziert. Da das CD28-Molekül keine akzessorischen Proteine für eine stabile Expression benötigt, wurde der chimäre AMI-CD28-Rezeptor ohne weitere Optimierungen auf der Oberfläche der transduzierten Zellen detektiert. Die durch Bindung des löslichen Proteins induzierte Phosphorylierung der Akt-Kinase bewies die Funktionalität der AMI-CD28 Kette als PSCA-spezifischer Rezeptor.

Diese Arbeit demonstriert die Generierung eines hochaffinen PSCA-spezifischen Einzelkettenantikörpers als eine Antigen-erkennende Struktur eines chimären Rezeptors. Die Armierung polyklonaler zytotoxischer T-Lymphozyten mit den funktionsfähigen chimären AMI-BetaC-CD3 ζ - und AMI-CD28-Rezeptoren stellt den ersten Schritt einer neuen Strategie zur Eliminierung maligner, hormon-refraktärer und metastasierender Prostatakarzinomzellen dar.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Ehrlich, P. & Apolant, H. (1908)
Referat über die Genese des Carzinoms. *Verhandlungen der Deutschen Pathologischen Gesellschaft.*, **12 S**, 13-32.
- [2] Thomas, L. (1959)
Discussion of Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States, ed. HS Lawrance. New York: Hoeber-Harper.
- [3] Burnet, F.M. (1970)
The concept of immunological surveillance. *Prog. Exp. Tumor Res.*, **13**, 1-27.
- [4] Kaplan, D.H., Shankaran, V., Dighe, A.S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L.J. & Schreiber, R.D. (1998)
Demonstration of an interferon γ -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **95**, 7556-7561.
- [5] Smyth, M.J., Thia, K.Y., Street, S.E., MacGregor, D., Godfrey, D.I. & Trapani, J.A. (2000)
Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med.*, **192**, 755-760.
- [6] Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J. & Schreiber, R.D. (2001)
IFN gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature.*, **410**, 1107-1111.
- [7] Zettergren, J.G., Luberoft, D.E. & Pretlow, T.G. (1973)
Separation of lymphocytes from disaggregated mouse malignant neoplasms by sedimentation in gradients of Ficoll in tissue culture medium. *J.Immunol.*, **111**, 836-840.
- [8] Blazer, B.A. & Heppner, G.H. (1978)
In situ lymphoid cells of mouse mammary tumours. I. development and evaluation of a method for the separation of lymphoid cells from mouse mammary tumours. *J.Immunol.*, **120**, 1881-1886.
- [9] Hansen, B.H., Gillespie, G.Y. & Russel, S.W. (1977)
Isolation of T lymphocytes from disaggregated tumours, with high purity and good percentage recovery. *J.Natl.Cancer Inst.*, **59**, 273-275.
- [10] Grimm, E.A., Mazumder, A., Zhang, H.Z. & Rosenberg, S.A. (1982)
Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med.*, **155**, 1823-1841.
- [11] Grimm, E.A., Ramsey, K.M., Mazumder, A., Wilson, D.J., Djeu, J.Y. & Rosenberg, S.A. (1983)
Lymphokine-activated killer cell phenomenon.II. Precursors phenotype is serologically distinct from peripheral T lymphocytes, memory cytotoxic thymus-derived lymphocytes, and natural killer cells. *J Exp Med.*, **157**, 884-897.
- [12] Mule, J.J., Shu, S., Schwarz, S.L. & Rosenberg, S.A. (1984)

- Adoptive immunotherapy of established pulmonary metastases with LAK cells and recombinant interleukin-2. *Science*, **225**, 1487-1489.
- [13] Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., Muul, L.M., Leitman, S., Chang, A.E., Ettinghausen, S.E., Matory, Y.L., Skibber, J.M., Shiloni, E., Vetto, J.T., Seipp, C.A., Simpson, C. & Reichert, C.M. (1985)
Observation on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med.*, **313**, 1485-1492.
- [14] Mule, J.J., Shu, S. & Rosenberg, S.A. (1985)
The anti-tumour efficacy of lymphokine-activated killer cells and recombinant IL-2 in vivo. *J Immunol.*, **135**, 646-652.
- [15] Mule, J.J., Yang, J., Shu, S. & Rosenberg, S.A. (1986)
The anti-tumour efficacy of lymphokine-activated killer cells and recombinant IL-2 in vivo: direct correlation between reduction of established metastases and cytolytic activity of lymphokine-activated killer cells. *J Immunol.*, **136**, 3899-3909.
- [16] Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., Muul, L.M., Chang, A.E., Avis, F.P., Leitman, S., Linehan, W.M., Robertson, C.N., Lee, R.E., Rubin, J.T., Seipp, C.A., Simpson, C.G. & White, D.E. (1987)
A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and IL-2 or high-dose IL-2 alone. *N Eng J Med.*, **316**, 889-897.
- [17] Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., Yang, J.C., Topalian, S.L., Chang, A.E., Schwartzentruber, D.J., Aebersold, P., Leitman, S., Linehan, W.M. & Seipp, C.A. (1993)
Prospective randomized trial of high-dose interleukin-2 alone or in conjunction with lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer. *J Natl Cancer Inst.*, **85**, 622-632.
- [18] Bretscher, P.A. & Cohn, M. (1970)
A theory of a self and non-self discrimination. *Science*, **169**, 1042-1049.
- [19] Inaba, K., Metlay, J.P., Crowley, M.T. & Steinman, R.M. (1990)
Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ. *J Exp Med.*, **172**, 631-640.
- [20] Meidenbauer, N., Marienhagen, J., Laumer, M., Vogl, S., Heymann, J., Andreesen, R. & Mackensen, A. (2003)
Survival and tumor localization of adoptively transferred Melan-A-specific T cells in melanoma patients. *J Immunol.*, **170**, 2161-2169.
- [21] Rosenberg, S.A., Yang, J.C., Schwartzentruber, D.J., Hwu, P., Marincola, F.M., Topalian, S.L., Restifo, N.P., Dudley, M.E., Schwarz, S.L., Spiess, P.J., Wunderlich, J.R., Parkhurst, M.R., Kawakami, Y., Seipp, C.A., Einhorn, J.H. & White, D.E. (1998)
Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nature Medicine*, **4**, 321-327.
- [22] Spiess, P.J., Yang, J.C. & Rosenberg, S.A. (1987)
In vivo antitumor activity of tumor-infiltrating lymphocytes expanded in recombinant interleukin-2. *J Natl Cancer Inst.*, **79**, 1067-1075.

- [23] Topalian, S.L., Solomon, D., Avis, F.P., Chang, A.E., Freerksen, D.L., Linehan, W.M., Lotze, M.T., Robertson, C.N., Seipp, C.A. & Simon, P. (1988)
Immunotherapy of patients with advanced cancer using tumor-infiltrating lymphocytes and recombinant interleukine-2: a pilot study. *J.Clin.Oncol.*, **6**, 839-853.
- [24] Dillman, R.O., Oldham, R.K., Barth, N.M., Cohen, R.J., Minor, D.R., Birch, R., Yannelli, J.R., Maleckar, J.R., Sferruzza, A. & Arnold, J. (1991)
Continuous interleukin-2 and tumor-infiltrating lymphocytes as treatment of advanced melanoma. A national biotherapy study group trial. *Cancer*, **68**, 1-8.
- [25] Quattrocchi, K.B., Miller, C.H., Cush, S., Bernard, S.A., Dull, S.T., Smith, M., Gudeman, S. & Varia, M.A. (1999)
Pilot study of local autologous tumor infiltrating lymphocytes for the treatment of recurrent malignant gliomas. *J Neurooncol.*, **45**, 141-157.
- [26] Figlin, R.A., Pierce, W.C., Kaboo, R., Tso, C.L., Moldawer, N., Gitlitz, B., deKernion, J. & Beldegrun, A. (1997)
Treatment of metastatic renal cell carcinoma with nephrectomy, interleukin-2 and cytokine-primed or CD8(+) selected tumor infiltrating lymphocytes from primary tumor. *J Urol.*, **158**, 740-745.
- [27] Finke, J.H., Rayman, P., Hart, L., Alexander, J.P., Edinger, M.G., Tubbs, R.R., Klein, E., Tuason, L. & Bukowski, R.M. (1994)
Characterization of tumor infiltrating lymphocytes subsets from human renal cell carcinoma: specific reactivity defined by cytotoxicity, interferon-gamma secretion and proliferation. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol.*, **15**, 91-104.
- [28] Hom, S.S., Rosenberg, S.A. & Topalian, S.L. (1993)
Specific immune recognition of autologous tumor by lymphocytes infiltrating colon carcinomas: analysis by cytokine secretion. *Cancer Immunol Immunother.*, **36**, 1-8.
- [29] Hoshino, T., Seki, N., Kikuchi, M., Kuramoto, T., Iwamoto, O., Kodama, I., Koufuji, K., Takeda, J. & Itoh, K. (1997)
HLA-class-I-restricted and tumor-specific CTL in tumor-infiltrating lymphocytes of patients with gastric cancer. *Int J Cancer*, **70**, 631-638.
- [30] Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Shelton, T.E., Even, J. & Rosenberg, S.A. (2003)
Generation of tumor-infiltrating lymphocyte cultures for use in adoptive transfer therapy for melanoma patients. *J Immunotherapie*, **26**, 332-342.
- [31] Rosenberg, S.A., Yannelli, J.R., Yang, J.C., Topalian, S.L., Schwartzentruber, D.J., Weber, J.S., Parkinson, D.R., Seipp, C.A., Einhorn, J.H. & White, D.E. (1994)
Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J Natl Cancer Inst.*, **86**, 1159-1166.
- [32] Rosenberg, S.A., Aebbersold, P., Cornetta, K., Kasid, A., Morgan, R.A., Moen, R., Karson, E.M., Lotze, M.T., Yang, J.C. & Topalian, S.L. (1990)
Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med.*, **323**, 570-578.

- [33] Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Robbins, P.F., Yang, J.C., Hwu, P., Schwartzentruber, D.J., Topalian, S.L., Sherry, R., Restifo, N.P., Hubicki, A.M., Robinson, M.R., Raffeld, M., Duray, P., Seipp, C.A., Rogers-Freezer, L., Morton, K.E., Mavroukakis, S.A., White, D.E. & Rosenberg, S.A. (2002)
Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes.
Science, **298**, 850-854.
- [34] Yee, C., Thompson, J.A., Byrd, D., Riddell, S.R., Roche, P., Celis, E. & Greenberg, P.D. (2002)
Adoptive T cell therapy using antigen specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: In vivo persistence, migration and anti-tumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **99**, 16168-16173.
- [35] Marzo, A.L., Kinnear, B.F., Lake, R.A., Frelinger, J.J., Collins, E.J., Robinson, B.W. & Scott, B. (2000)
Tumor-specific CD4+ T cells have a major „post-licensing“ role in CTL mediated anti-tumor immunity. *J Immunol.*, **165**, 6047-6055.
- [36] Tan, R., Xu, X., Ogg, G.S., Hansasuta, P., Dong, T., Rostron, T., Luzzi, G., Conlon, C.P., Screaton, G.R., McMichael, A.J. & Rowland-Jones, S. (1999)
Rapid death of adoptively transferred T cells in acquired immunodeficiency syndrome. *Blood*, **93**, 1506-1510.
- [37] Rosenberg, S.A., Packard, B.S., Aebersold, P.M., Solomon, D., Topalian, S.L., Toy, S.T., Simon, P., Lotze, M.T., Yang, J.C. & Seipp, C.A. (1988)
Use of tumor-infiltrating lymphocytes and IL-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N Engl J Med.*, **319**, 1676-1680.
- [38] Köhler, G. & Milstein, C. (1975)
Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**, 495-497.
- [39] Ortaldo, J.R., Woodhouse, C., Morgan, A.C., Herberman, R.B., Cheresch, D.A. & Reisfeld, R. (1987)
Analysis of effector cells in human antibody-dependent cellular cytotoxicity with murine monoclonal antibodies. *J Immunol.*, **138**, 3566-3572.
- [40] Hellstrom, I., Garrigues, U., Lavie, E. & Hellstrom, K.E. (1988)
Antibody-mediated killing of human tumor cells by attached effector cells. *Cancer Res.*, **48**, 624-627.
- [41] Hellstrom, I., Garrigues, U., Lavie, E. & Hellstrom, K.E. (1998)
Fc Receptors are required in passive and active immunity of melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **95**, 652-656.
- [42] Houghton, A.N., Mintzer, D., Cordon-Cardo, C., Welt, S., Fliegel, B., Vadhan, S., Carswell, E., Melamed, M.R., Oettgen, H.F. & Old, L.J. (1985)
Mouse monoclonal IgG3 antibody detecting GD3 ganglioside: a phase I trial in patients with malignant melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **82**, 1242-1246.
- [43] Gorter, A. & Meri, S. (1999)
Immune evasion of tumor cells using membrane-bound complement regulatory proteins.

Immunol Today., **20**, 576-582.

- [44] Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J. & Ullrich, A. (1989)
Studies of the HER2/NEU proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, **244**, 707-712.
- [45] Clark, G.M. & McGuire, W.L. (1991)
Follow-up study of HER2/neu amplification in primary breast cancer. *Cancer Res.*, **51**, 944-948.
- [46] Cobleigh, M.A., Vogel, C.L., Tripathy, D., Robert, N.J., Scholl, S., Fehrenbacher, L., Wolter, J.M., Paton, V., Shak, S., Lieberman, G. & Slamon, D.J. (1999)
Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol.*, **17**, 2639-2648.
- [47] Willett, C.G., Boucher, Y., di Tomaso, E., Duda, D.G., Munn, L.L., Tong, R.T., Chung, D.C., Sahani, D.V., Kalva, S.P., Kozin, S.V., Mino, M., Cohen, K.S., Scadden, D.T., Hartford, A.C., Fischman, A.J., Clark, J.W., Ryan, D.P., Zhu, A.X., Blaszkowsky, L.S., Chen, H.X., Shellito, P.C., Lauwers, G.Y. & Jain, R.K. (2004)
Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasculature effects in human rectal cancer. *Nat Med.*, **10**, 145-147.
- [48] Ferrajoli, A., O'Brien, S. & Keating, M.J. (2001)
Alemtuzumab: a novel monoclonal antibody. *Expert Opin Biol Ther.*, **1**, 1059-1065.
- [49] Leyland-Jones, B. (2002)
Trastuzumab therapy for the metastatic patient: does the primary match? *Ann Oncol.*, **13**, 993-994.
- [50] Sievers, E.L. & Linenberger, M. (2001)
Mylotarg: antibody-targeted chemotherapy comes of age. *Curr Opin Oncol.*, **13**, 522-527.
- [51] Riethmuller, G., Holz, E., Schlimok, G., Schmiegel, W., Raab, R., Hoffken, K., Gruber, R., Funke, I., Pichlmaier, H., Hirche, H., Buggisch, P., Witte, J. & Pichlmayr, R. (1998)
Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial. *J Clin Oncol.*, **16**, 1788-1794.
- [52] Grillo-Lopez, A.J. (2003)
Rituximab (Rituxan/MabThera): the first decade (1993-2003). *Expert Rev Anticancer Ther.*, **3**, 767-779.
- [53] Slamon, D.J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J. & Norton, L. (2001)
Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med.*, **344**, 783-792.
- [54] Slamon, D. & Pegram, M. (2001)
Rationale for trastuzumab (Herceptin) in adjuvant breast cancer trials. *Semin Oncol.*, **28**, 13-19.

- [55] Riethmuller, G., Schneider-Gadicke, E., Schlimok, G., Schmiegell, W., Raab, R., Hoffken, K., Gruber, R., Pichlmaier, H., Hirche, H. & Pichlmayr, R. (1994)
Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes' C colorectal carcinoma. German Cancer Aid 17-1A Study Group. *Lancet.*, **343**, 1177-1183.
- [56] Herlyn, M., Steplewski, Z., Herlyn, D. & Koprowski, H. (1979)
Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **76**, 1438-1442.
- [57] Halin, C., Zardi, L. & Neri, D. (2001)
Antibody-based targeting of angiogenesis. *News Physiol Sci.*, **16**, 191-194.
- [58] Lamers, C.H., Gratama, J.W., Warnaar, S.O., Stoter, G. & Bolhuis, R.L. (1995)
Inhibition of bispecific monoclonal antibody (bsAb)-targeted cytotoxicity by human anti-mouse antibodies in ovarian carcinoma patients treated with bsAb-targeted activated T-lymphocytes. *Int J Cancer.*, **60**, 450-457.
- [59] Reynolds, J.C., Del Vecchio, S., Sakahara, H., Lora, M.E., Carrasquillo, J.A., Neumann, R.D. & Larson, S.M. (1989)
Anti-murine antibody response to mouse monoclonal antibodies: clinical findings and implications. *Int J Rad Appl Instrum B.*, **16**, 121-125.
- [60] Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E. & Hoogenboom, H.R. (1994)
Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol.*, **12**, 433-455.
- [61] Sevcik, E.M. & Jain, R.K. (1989)
Geometric resistance to blood flow in solid tumors perfused ex vivo: effects of tumor size and perfusion pressure. *Cancer Res.*, **49**, 3506-3512.
- [62] Sevcik, E.M. & Jain, R.K. (1989)
Viscous resistance to blood flow in solid tumors: effect of hematocrit on intratumor blood viscosity. *Cancer Res.*, **49**, 3513-3519.
- [63] Hedrick, S.M., Nielsen, E.A., Kavalier, J., Cohen, D.I. & Davis, M.M. (1984)
Sequence relationships between putative T-cell receptor polypeptides and immunoglobulins. *Nature*, **308**, 153-158.
- [64] Clevers, H., Alarcon, B., Wileman, T. & Terhorst, C. (1988)
The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol.*, **6**, 629-662.
- [65] Kuwana, Y., Asakura, Y., Utsunomiya, N., Nakanishi, M., Arata, Y., Itoh, S., Nagase, F. & Kurosawa, Y. (1987)
Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions. *Biochem Biophys Res Commun.*, **149**, 960-968.
- [66] Becker, M.L., Near, R., Mudgett-Hunter, M., Margolies, M.N., Kubo, R.T., Kaye, J. & Hedrick, S.M. (1989)
Expression of a hybrid immunoglobulin-T cell receptor protein in transgenic mice. *Cell.*, **58**, 911-921.
- [67] Gorman, J., Gomez, S.M., Segesman, K.D., Hunkapiller, T., Laug, W.E. & Hood, L. (1990)

- Chimeric immunoglobulin-T cell receptor proteins form functional receptors: implications for T cell receptor complex formation and activation. *Cell.*, **60**, 929-939.
- [68] Gross, G., Waks, T. & Eshhar, Z. (1989)
Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **86**, 10024-10028.
- [69] Irving, B.A. & Weiss, A. (1991)
The cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways. *Cell.*, **64**, 891-901.
- [70] Bird, R.E., Hardman, K.D., Jacobson, J.W., Johnson, S., Kaufman, B.M., Lee, S.M., Lee, T., Pope, S.H., Riordan, G.S. & Whitlow, M. (1988)
Single-chain antigen-binding proteins. *Science.*, **242**, 423-426.
- [71] Eshhar, Z., Waks, T., Gross, G. & Schindler, D.G. (1993)
Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **90**, 720-724.
- [72] Stancovski, I., Schindler, D.G., Waks, T., Yarden, Y., Sela, M. & Eshhar, Z. (1993)
Targeting of T lymphocytes to Neu/HER2-expressing cells using chimeric single chain Fv receptors. *J Immunol.*, **151**, 6577-6582.
- [73] Moritz, D., Wels, W., Mattern, J. & Groner, B. (1994)
Cytotoxic T lymphocytes with a grafted recognition specificity for ERBB2-expressing tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **91**, 4318-4322.
- [74] Hwu, P., Yang, J.C., Cowherd, R., Treisman, J., Shafer, G.E., Eshhar, Z. & Rosenberg, S.A. (1995)
In vivo antitumor activity of T cells redirected with chimeric antibody/T-cell receptor genes. *Cancer Res.*, **55**, 3369-3373.
- [75] Haynes, N.M., Trapani, J.A., Teng, M.W., Jackson, J.T., Cerruti, L., Jane, S.M., Kershaw, M.H., Smyth, M.J. & Darcy, P.K. (2002)
Single-chain antigen recognition receptors that costimulate potent rejection of established experimental tumors. *Blood.*, **100**, 3155-3163.
- [76] Parker, L.L., Do, M.T., Westwood, J.A., Wunderlich, J.R., Dudley, M.E., Rosenberg, S.A. & Hwu, P. (2000)
Expansion and characterization of T cells transduced with a chimeric receptor against ovarian cancer. *Hum Gene Ther.*, **11**, 2377-2387.
- [77] Hombach, A., Schneider, C., Sent, D., Koch, D., Willemsen, R.A., Diehl, V., Kruis, W., Bolhuis, R.L., Pohl, C. & Abken, H. (2000)
An entirely humanized CD3 zeta-chain signaling receptor that directs peripheral blood t cells to specific lysis of carcinoembryonic antigen-positive tumor cells.
Int J Cancer. **88**, 115-120.
- [78] Hombach, A., Mucic, J.M., Gerken, M., Gellrich, S., Heuser, C., Pohl, C., Sterry, W. & Abken, H. (2001)

- T cells engrafted with a recombinant anti-CD30 receptor target autologous CD30(+) cutaneous lymphoma cells. *Gene Ther.*, **8**, 891-895.
- [79] Niederman TM, Ghogawala Z, Carter BS, Tompkins HS, Russell MM, Mulligan RC. (2002)
Antitumor activity of cytotoxic T lymphocytes engineered to target vascular endothelial growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **99**, 7009-7014.
- [80] Haynes, N.M., Snook, M.B., Trapani, J.A., Cerruti, L., Jane, S.M., Smyth, M.J. & Darcy, P.K. (2001)
Redirecting mouse CTL against colon carcinoma: superior signaling efficacy of single-chain variable domain chimeras containing TCR-zeta vs Fc epsilon RI-gamma. *J Immunol.*, **166**, 182-187.
- [81] Brentjens, R.J., Latouche, J.B., Santos, E., Marti, F., Gong, M.C., Lyddane, C., King, P.D., Larson, S., Weiss, M., Riviere, I. & Sadelain, M. (2003)
Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. *Nat Med.*, **9**, 279-286.
- [82] Lafferty, K.J. & Woolnough, J. (1977)
The origin and mechanism of the allograft reaction. *J Immunol Rev.*, **35**, 231-262.
- [83] Lafferty, K.J., Prowse, S.J., Simeonovic, C.J. & Warren, H.S. (1983)
Immunobiology of tissue transplantation: a return to the passenger leukocyte concept. *Annu Rev Immunol.*; **1**, 143-173.
- [84] Greenfield, E.A., Nguyen, K.A. & Kuchroo, V.K. (1998)
CD28/B7 costimulation: a review. *Crit.Rev.Immunol.*, **18**, 389-418.
- [85] June, C.H., Bluestone, J.A., Nadler, L.M. & Thompson, C.B. (1994)
The B7 and CD28 receptor families. *Immunol. Today*, **15**, 321-331.
- [86] Hombach, A., Sent, D., Schneider, C., Heuser, C., Koch, D., Pohl, C., Seliger, B. & Abken, H. (2001)
T-cell activation by recombinant receptors: CD28 costimulation is required for interleukin 2 secretion and receptor-mediated T-cell proliferation but does not affect receptor-mediated target cell lysis. *Cancer Res.*, **61**, 1976-1982.
- [87] Alvarez-Vallina, L. & Hawkins, R.E. (1996)
Antigen-specific targeting of CD28-mediated T cell co-stimulation using chimeric single-chain antibody variable fragment-CD28 receptors. *Eur J Immunol.*, **26**, 2304-2309.
- [88] Finney, H.M., Lawson, A.D., Bebbington, C.R. & Weir, A.N. (1998)
Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product. *J Immunol.*, **161**, 2791-2797.
- [89] Haynes, N.M., Trapani, J.A., Teng, M.W., Jackson, J.T., Cerruti, L., Jane, S.M., Kershaw, M.H., Smyth, M.J. & Darcy, P.K. (2002)
Single-chain antigen recognition receptors that costimulate potent rejection of established experimental tumors. *Blood.*, **100**, 3155-3163.
- [90] Robert Koch Institut Berlin (2004):
Krebs in Deutschland. Häufigkeiten und Trends.
- [91] Witjes, W.P., Oosterhof, G.O., Schaafsma, H.E. & Debruyne, F.M. (1995)

- Current status of neoadjuvant therapy in localized prostate cancer. *Prostate.*, **27**, 297-303.
- [92] Wang, M.C., Valenzuela, L.A., Murphy, G.P. & Chu, T.M. (1979)
Purification of a human prostate specific antigen. *Investig Urol.*, **17**, 159-163.
- [93] Vihko, P., Virkkunen, P., Henttu, P., Roiko, K., Solin, T., Huhtala, M.L. (1988)
Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding human prostatic acid phosphatase. *FEBS Lett.*, **236**: 275-281.
- [94] Sells, S.F., Wood, D.P.Jr., Joshi-Barve, S.S., Muthukumar, S., Jacob, R.J., Crist, S.A., Humphreys, S. & Rangnekar, V.M. (1994)
Commonality of the gene programs induced by effectors of apoptosis in androgen-dependent and -independent prostate cells. *Cell Growth Differ.*, **4**, 457-466.
- [95] Reiter, R.E., Gu, Z., Watabe, T., Thomas, G., Szigeti, K., Davis, E., Wahl, M., Nisitani, S., Yamashiro, J., Le Beau, M.M., Loda, M. & Witte, O.N. (1998)
Prostate stem cell antigen: A surface marker overexpressed in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **95**, 1735-1740.
- [96] Gu, Z., Thomas, G., Yamashiro, J., Shintaku, I.P., Dorey, F., Raitano, A., Witte, O.N., Said, J.W., Loda, M. & Reiter, R.E. (2000)
Prostate stem cell antigen (PSCA) expression increases with high gleason score, advanced stage and bone metastasis in prostate cancer. *Oncogene*, **19**, 1288-1296.
- [97] Lam, J.S., Yamashiro, J., Shintaku, I.P., Vessella, R.L., Jenkins, R.B., Horwath, S., Said, J.W. & Reiter, R.E. (2005)
Prostate stem cell antigen is overexpressed in prostate cancer metastases. *Clin Cancer Res.*, **11**, 2591-2596.
- [98] Dannull, J., Diener, P.A., Prikler, L., Fürstenberger, G., Cerny, T., Schmid, U., Ackermann, D.K. & Groettrup, M. (2000)
Prostate stem cell antigen is a promising candidate for immunotherapy of advanced prostate cancer. *Cancer Res.*, **60**, 5522-5528.
- [99] Kiessling, A., Schmitz, M., Stevanovic, S., Weigle, B., Hölig, K., Füßel, M., Füßel, S., Meye, A., Wirth, M.P. & Rieber, E.P. (2002)
Prostate stem cell antigen: identification of reactive CD8+ T cells in prostate cancer patients. *Int J Cancer*, **102**, 390-397.
- [100] Saffran, D.C., Raitano, A.B., Hubert, R.S., Witte, O.N., Reiter, R.E., Jakobovits, A. (2001)
Anti-PSCA mAbs inhibit tumor growth and metastasis formation and prolong the survival of mice bearing human prostate cancer xenografts. *PNAS.*, **98**, 2658-2663.
- [101] Hanahan, D. (1983)
Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol.*, **166**, 557-580.
- [102] Holmes, D. S. & Quigley, M. (1981)
A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem.*, **114**, 193-197.
- [103] Laemmli, U.,K. (1970)

- Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, **227**, 680-685.
- [104] Franke, T.F., Kaplan, D.R. & Cantley, L.C. (1997)
PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell.*, **88**, 435-437.
- [105] Burgering, B.,M. & Coffey, P.,J. (1995)
Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature.*, **376**, 599-602.
- [106] Cantrell, D. (1996)
T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu Rev Immunol.*, **14**, 259-274.
- [107] Irving, B.A., Chan, A.C. & Weiss, A. (1993)
Functional characterization of a signal transducing motif present in the T cell antigen receptor zeta chain. *J Exp Med.*, **177**, 1093-1103.
- [108] Aoe, T., Goto, S., Ohno, H. & Saito, T. (1994)
Different cytoplasmic structure of the CD3 zeta family dimer modulates the activation signal and function of T cells. *Int Immunol.*, **6**, 1671-1679.
- [109] Bradford, M.M. (1976)
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, **72**, 248-254.
- [110] Soneoka, Y., Cannon, P.M., Ramsdale, E.E., Griffiths, J.C., Romano, G., Kingsman, S.M. & Kingsman, A.J. (1995)
A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 628-633.
- [111] Temme, A., Rieger, M., Reber, F., Lindemann, D., Weigle, B., Diestelkoetter-Bachert, P., Ehninger, G., Tatsuka, M., Terada, Y., Rieber, E.P. (2003)
Localization, dynamics, and function of survivin revealed by expression of functional survivinDsRed fusion proteins in the living cell. *Mol Biol Cell.*, **14**, 78-92.
- [112] Mitani, K. & Caskey, C.T. (1993)
Delivering therapeutic genes--matching approach and application. *Trends Biotechnol.*, **11**, 162-166.
- [113] Wang, Z., Raifu, M., Howard, M., Smith, L., Hansen, D., Goldsby, R. & Ratner, D. (2000)
Universal PCR amplification of mouse immunoglobulin gene variable regions: the design of degenerate primers and an assessment of the effect of DNA polymerase 3' to 5' exonuclease activity. *J Immunol Methods.*, **233**, 167-177.
- [114] Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997)
Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, **25**; 3389-3402.
- [115] Williams, G.S., Martinez, A., Montalbano, A., Tang, A., Mauhar, A., Ogwaro, K.M., Merz, D., Chevillard, C., Riblet, R. & Feeney, A. J. (2001)

Unequal VH gene rearrangement frequency within the large VH7183 gene family is not due to recombination signal sequence variation, and mapping of the genes shows a bias of rearrangement based on chromosomal location. *J Immunol.*, **167**, 257-263.

- [116] Sze, D.M.Y., Taylor, D.R., MacLennan, I.C.M. & Toellner, K.M.

unpublizierte Daten

- [117] Furukawa, K., Manabe, A., Furukawa, A., Kuba, H., Okajima, T. & Azuma, T.

Initial Repertoire of Anti-(4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl) Antibodies as Potential Donors for Effective Affinity Maturation. unpublizierte Daten

- [118] Schaeble, K.F., Thiebe, R., Bensch, A., Brensing-Kueppers, J., Heim, V., Kirschbaum, T., Lamm, R., Ohnrich, M., Pourrajabi, S., Roeschenthaler, F., Schwendinger, J., Wichelhaus, D. & Zocher Zachau, H.G. (1999)

Characteristics of the immunoglobulin V kappa genes, pseudogenes, relics and orphans in the mouse genome. *Eur J Immunol.*, **29**, 2082-2086.

- [119] Woodward, E.J. & Thomas, J.W.

Germline Polymorphisms in NOD. unpublizierte Daten

- [120] Bird, R.E., Hardman, K.D., Jacobson, J.W., Johnson, S., Kaufman, B.M., Lee, S.M., Lee, T., Pope, S.H., Riordan, G.S. & Whitlow, M. (1988)

Single-chain antigen-binding proteins. *Science.*, **242**, 423-426.

- [121] Huston, J.S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M.S., Novotny, J., Margolies, M.N., Ridge, R. J., Bruccoleri, R.E., Haber, E. & Crea, R. (1988)

Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **85**, 5879-5883.

- [122] Maher, J., Brentjens, R.J., Gunset, G., Rivere, I. & Sadelain, M. (2002)

Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor. *Nat Biotechnol.*, **20**, 70-75.

- [123] Ma, Q., Safar, M., Holmes, E., Wang, Y., Boynton, A.L. & Junghans, R.P. (2004)

Anti-prostate specific membrane antigen **designer** T cells for prostate cancer therapy. *Prostate.*, **61**, 12-25.

- [124] Pinthus, J.H., Waks, T., Malina, V., Kaufman-Francis, K., Harmelin, A., Aizenberg, I., Kanety, H., Ramon, J. & Eshhar, Z. (2004)

Adoptive immunotherapy of prostate cancer bone lesions using redirected effector lymphocytes. *J Clin Invest.*, **114**, 1774-1781.

- [125] Ross, S., Spencer, S.D., Holcomb, I., Tan, C., Hongo, J., Devaux, B., Rangell, L., Keller, G.A., Schow, P., Steeves, R.M., Lutz, R.J., Frantz, G., Hillan, K., Peale, F., Tobin, P., Eberhard, D., Rubin, M.A., Lasky, L.A. & Koeppen, H. (2002)

Prostate stem cell antigen as therapy target: tissue expression and in vivo efficacy of an immunoconjugate. *Cancer Res.*, **62**, 2546-2553.

- [126] Zhigang, Z. & Wenlv, S. (2004)

- Prostate stem cell antigen (PSCA) expression in human prostate cancer tissues: implications for prostate carcinogenesis and progression of prostate cancer. *Jpn J Clin Oncol.*, **34**, 414-419.
- [127] Chitarra, V., Alzari, P.M., Bentley, G.A., Bhat, T.N., Eisele, J.L., Houdusse, A., Lescar, J., Souchon, H. & Poljak, R.J. (1993)
Three-dimensional structure of a heteroclitic antigen-antibody cross-reaction complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **90**, 7711-7715.
- [128] Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H.H., Gottesman, K.S. & Foeller, C. (1991)
Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edn. US Department of Health and Humans Services, Public Health Service, NIH.
- [129] Chiang, Y.L., Sheng-Dong, R., Brow, M.A. & Larrick, J.W. (1989)
Direct cDNA cloning of the rearranged immunoglobulin variable region. *Biotechniques.*, **7**, 360-366.
- [130] Orlandi, R., Gussow, D.H., Jones, P.T. & Winter, G. (1992)
Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. 1989. *Biotechnology.*, **24**, 527-531.
- [131] Nicholls, P.J., Johnson, V.G., Blanford, M.D. & Andrew, S.M. (1993)
An improved method for generating single-chain antibodies from hybridomas. *J Immunol Methods.*, **165**, 81-91.
- [132] Dattamajumdar, A.K., Jacobson, D.P., Hood, L.E. & Osman G.E. (1996)
Rapid cloning of any rearranged mouse immunoglobulin variable genes. *Immunogenetics.*, **43**, 141-151.
- [133] Krebber, A., Bornhauser, S., Burmester, J., Honegger, A., Willuda, J., Bosshard, H.R. & Pluckthun, A. (1997)
Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *J Immunol Methods.*, **201**, 35-55.
- [134] Dübel, S., Breitling, F., Fuchs, P., Zewe, M., Gotter, S., Welschof, M., Moldenhauer, G. & Little, M. (1994)
Isolation of IgG antibody Fv-DNA from various mouse and rat hybridoma cell lines using the polymerase chain reaction with a simples set of primers. *J Immunol Methods.*, **175**, 89-95.
- [135] Fuchs, P., Breitling, F., Little, M. & Dübel, S. (1997)
Primary structure and functional scFv antibody expression of an antibody against the human protooncogen c-myc. *Hybridoma.*, **16**, 227-233.
- [136] Edelman, G.M. (1991)
Antibody structure and molecular immunology. *Scand J Immunol.*, **34**, 1-22.
- [137] Bird, R.E., Hardman, K.D., Jacobson, J.W., Johnson, S., Kaufman, B.M., Lee, S.M., Lee, T., Pope, S.H., Riordan, G.S. & Whitlow, M. (1988)
Single chain antigen binding proteins. *Science.*, **242**, 423-426.

- [138] Takkinen, K., Laukkanen, M.L., Sizmann, D., Alfthan, K., Immonen, T., Vanne, L., Kaartinen, M., Knowles, J.K.C. & Teeri, T.T. (1991)
An active single-chain antibody containing a cellulase linker domain is secreted by *Escherichia coli*. *Protein Eng.*, **4**, 837-841.
- [139] Dolezal, O., Pearce, L.A., Lawrence, L.J., McCoy, A.J., Hudson, P.J. & Kortt, A.A. (2000)
ScFv multimers of the anti-neuraminidase antibody NC10: shortening of the linker in single-chain Fv fragment assembled in V(L) to V(H) orientation drives the formation of dimers, trimers, tetramers and higher molecular mass multimers. *Protein Eng.*, **13**, 565-574.
- [140] Tate, C.G., Haase, J., Baker, C., Boorsma, M., Magnani, F., Vallis, Y. & Williams, D.C. (2003)
Comparison of seven different heterologous protein expression systems for the production of the serotonin transporter. *Biochim Biophys Acta.*, **1610**, 141-153.
- [141] Varma, R. & Mayor, S. (1998)
GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature.*, **394**, 798-801.
- [142] Friedrichson, T. & Kurzchalia, T.V. (1998)
Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking. *Nature.*, **394**, 802-805.
- [143] Hoessli, D.C. & Robinson, P.J. (1998)
GPI-anchors and cell membranes: a special relationship. *Trends Cell Biol.*, **8**, 87-89.
- [144] Halin, C. & Neri, D. (2001)
Antibody-Based targeting of angiogenesis. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.*, **218**, 299-339.
- [145] Yokota, T., Milenic, D.E., Whitlow, M. & Schlom, J. (1992)
Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res.*, **52**, 3402-3408.
- [146] Begent, R.H., Verhaar, M.J., Chester, K.A., Casey, J.L., Green, A.J., Napier, M.P., Hope-Stone, L.D., Cushen, N., Keep, P.A., Johnson, C.J., Hawkins, R.E., Hilson, A.J. & Robson, L. (1996)
Clinical evidence of efficient tumor targeting based on single-chain Fv antibody selected from a combinatorial library. *Nat Med.*, **2**, 979-984.
- [147] Alvarez, R.D. & Curiel, D.T. (1997)
A phase I study of recombinant adenovirus vector-mediated delivery of an anti-erbB-2 single-chain (sFv) antibody gene for previously treated ovarian and extraovarian cancer patients. *Hum Gene Ther.*, **8**, 229-242.
- [148] Gross, G. & Eshhar, Z. (1992)
Endowing T cells with antibody specificity using chimeric T cell receptors. *FASEB J.*, **6**, 3370-3378.
- [149] Gross, G., Gorochoff, G., Waks, T. & Eshhar, Z. (1989)
Generation of effector T cells expressing chimeric T cell receptors with antibody type specificity. *Trans Proc.*, **21**, 127-130.
- [150] Lustgarten, J. & Eshhar, Z. (1995)

- Specific elimination of IgE production using T cell lines expressing chimeric T cell receptor genes. *Eur J Immunol.*, **25**; 2985-2991.
- [151] Moritz, D. & Groner, B. (1995)
A spacer region between the single chain antibody- and the CD3 zeta-chain domain of chimeric T cell receptor components is required for efficient ligand binding and signaling activity. *Gene Ther.*, **2**, 539-546.
- [152] Patel, S.D., Moskalenko, M., Smith, D., Maske, B., Finer, M.H. & McArthur, J.G. (1999)
Impact of chimeric immune receptor extracellular protein domains on T cell function. *Gene Ther.*, **6**, 412-419.
- [153] Jensen, M., Tan, G., Forman, S., Wu, A.M. & Raubitschek, A. (1998)
CD20 is a molecular target for scFvFc:zeta receptor redirected T cells: implications for cellular immunotherapy of CD20+ malignancy. *Biol Blood Marrow Transplant.*, **4**, 75-83.
- [154] Hombach, A., Koch, D., Sircar, R., Heuser, C., Diehl, V., Kruis, W., Pohl, C. & Abken, H. (1999)
A chimeric receptor that selectively targets membrane-bound carcinoembryonic antigen (mCEA) in the presence of soluble CEA. *Gene Ther.*, **6**, 300-304.
- [155] Bentley, G.A. & Mariuzza, R.A. (1996)
The structure of the T cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol.*, **14**, 563-590.
- [156] Bole, D.G., Hendershot, L.M. & Kearney, J.F. (1986)
Posttranslational association of immunoglobulin heavy chain binding protein with nascent heavy chains in nonsecreting and secreting hybridomas. *J Cell Biol.*, **102**, 1558-1566.
- [157] Chen, C., Bonifacino, J. S., Yuan, L. & Klausner, R.D. (1988)
Selective degradation of T cell antigen receptor chains retained in a pre-Golgi compartment. *J Cell Biol.*, **107**, 2149-2161.
- [158] Bonifacino, J.S., Suzuki, C.K., Lippincott-Schwartz, J., Weismann, A.M. & Klausner R.D. (1989)
Pre-Golgi degradation of newly synthesized T-cell antigen receptor chains: intrinsic sensitivity and the role of subunit assembly. *J Cell Biol.*, **109**, 73-83.
- [159] Wileman, T., Carson, G.R., Concino, M., Ahmed, A. & Terhorst, C. (1990)
The gamma and epsilon subunits of the CD3 complex inhibit pre-Golgi degradation of newly synthesized T cell antigen receptors. *J Cell Biol.*, **110**, 973-986.
- [160] Wileman, T., Pettey, C. & Terhorst, C. (1990)
Recognition for degradation in the endoplasmic reticulum and lysosomes prevents the transport of single TCR beta and CD3 delta subunits of the T-cell antigen receptor to the surface of cells. *Int Immunol.*, **2**, 743-754.
- [161] Wileman, T., Carson, G.R., Shih, F.F., Concino, M.F. & Terhorst, C. (1990)
The transmembrane anchor of the T cell antigen receptor β chain contains a structural determinant of pre-Golgi proteolysis. *Cell Regulation*, **1**; 907-919.
- [162] Bonifacino, J.S., Cosson, P., Shah, N. & Klausner, R. D. (1991)
Role of potentially charged transmembrane residues in targeting proteins for retention and degradation within the endoplasmic reticulum. *EMBO J.*, **10**, 2783-2793.

- [163] Jackson, M.R., Nilsson, T. & Peterson, P.A. (1990)
Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.*, **9**, 3153-3162.
- [164] Ohashi, P.S., Mak, T.W., Van den Elsen, P., Yanagi, Y., Yoshikai, Y., Calman, A.F., Terhorst, C., Stobo, J.D. & Weiss, A. (1985)
Reconstitution of an active surface T3/T-cell antigen receptor by DNA transfer. *Nature.*, **316**, 606-609.
- [165] Chung, S. & Strominger, J. (1995)
Regulation of T-cell antigen receptor (TCR) alpha-chain expression by TCR beta-chain transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **92**, 3712-3716.
- [166] Tan, L., Turner, J. & Weiss, A. (1991)
Regions of the T cell receptor alpha and beta chains that are responsible for interactions with CD3. *J Exp Med.*, **173**, 1247-1256.
- [167] Movassagh, M., Boyer, O., Burland, M., Leclercq, V., Klatzmann, D. & Lemoine, F.M. (2000)
Retrovirus-mediated gene transfer into T cells: 95% transduction efficiency without further in vitro selection. *Hum Gene Ther.*, **11**, 1189-1200.
- [168] Bell, L.M., Solomon, K.R., Gold, J.P. & Tan, K. (1994)
Cytoplasmic tail deletion of T cell receptor (TCR) beta-chain results in its surface expression as glycosylphosphatidylinositol-anchored polypeptide on mature T cells in the absence of TCR-alpha. *J Biol Chem.*, **269**, 22758-22763.
- [169] Groettrup, M. & Boehmer, H. (1993)
T cell receptor beta chain dimers on immature thymocytes from normal mice. *Eur J Immunol.*, **23**, 1393-1396.
- [170] Germain, R. N. & Stefanova, I. (1999)
The dynamics of T cell receptor signaling: complex orchestration and the key roles of tempo and cooperation. *Annu Rev Immunol.*, **17**, 467-522.
- [171] Amigorena, S., Salamero, J., Davoust, J., Fridman, W.H. & Bonnerot, C. (1992)
Tyrosine-containing motif that transduces cell activation signals also determines internalization and antigen presentation via type III receptors for IgG. *Nature.*, **358**, 337-341.
- [172] Manolios, N., Bonifacino, J.S. & Klausner, R.D. (1990)
Transmembrane helical interactions and the assembly of the T cell receptor complex. *Science.*, **249**, 274-277.
- [173] Kirchgessner, H., Dietrich, J., Scherer, J., Isomaki, P., Korinek, V., Hilgert, I., Bruyns, E., Leo, A., Cope, A.P. & Schraven, B. (2001)
The transmembrane adaptor protein TRIM regulates T cell receptor (TCR) expression and TCR-mediated signaling via an association with the TCR zeta chain. *J Exp Med.*, **193**, 1269-1284.
- [174] Liu, C.P. Lin, W.J., Huang, M., Kappler, J.W. & Marrack, P. (1997)
Development and function of T cells in T cell antigen receptor/CD3 zeta knockout mice reconstituted with Fc epsilon RI gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **94**, 616-621.

- [175] Weissman, A.M., Frank, S.J., Orloff, D.G., Mercep, M., Ashwell, J.D. & Klausner, R.D. (1989)
Role of the zeta chain in the expression of the T cell antigen receptor: genetic reconstitution studies. *EMBO J.*, **8**, 3651-3656.
- [176] Eshhar, Z. (1997)
Tumor-specific T-bodies: towards clinical application. *Cancer Immunol Immunother.*, **45**, 131-136.
- [177] Monks, C.R., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N. & Kupfer, A. (1998)
Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature.*, **395**, 82-86.
- [178] Iezzi, G., Karjalainen, K. & Lanzavecchia, A. (1998)
The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity.*, **8**, 89-95.
- [179] Ullrich, A. & Schlessinger, J. (1990)
Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell.*, **61**, 203-212.
- [180] Heldin, C. H. (1995)
Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell.*, **80**, 213-223.
- [181] Kolanus, W., Romeo, C. & Seed, B. (1993)
T cell activation by clustered tyrosine kinases. *Cell.*, **74**, 171-183.
- [182] Weiss, A. & Littman, D. (1994)
Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell.*, **76**; 263-274.
- [183] Romeo, C. & Seed, B. (1991)
Cellular immunity to HIV activated by CD4 fused to T cell or Fc receptor polypeptides. *Cell.*, **64**, 1037-1046.
- [184] Greenfield, E.A., Nguyen, K.A. & Kuchroo, V.K. (1998)
CD28/B7 costimulation: a review. *Crit. Rev. Immunol.*, **18**, 389-418.
- [185] Nelson, B.H., Lord, J.D. & Greenberg, P.D. (1994)
Cytoplasmic domains of the interleukin-2 receptor beta and gamma chains mediate the signal for T-cell proliferation. *Nature.*, **369**, 333-336.
- [186] Oosterwegel, M.A., Greenwald, R.J., Mandelbrot, D.A., Lorschach, R.B. & Sharpe, A.H. (1999)
CTLA-4 and T cell activation. *Curr Opin Immunol.*, **11**, 294-300.
- [187] Finney, H.M., Akbar, A.N. & Lawson, A.D.G. (2004)
Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors: costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR zeta chain. *J Immunol.*, **172**, 104-113.
- [188] June, C.H., Bluestone, J.A., Nadler, L.M. & Thomson, C.B. (1994)
The B7 and CD28 receptor families. *Immunol Today.*, **15**, 321-331.
- [189] Dustin, M.L. & Shaw, A.S. (1999)
Costimulation: building an immunological synapse. *Science.*, **283**, 649-650.
- [190] Viola, A., Schröder, S., Sakakibara, Y. & Lanzavacchia, A. (1999)
T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science.*, **283**, 680-682.

- [191] **Simons, K. & Toomre, D.** (2000)
Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **1**, 31-39.
- [192] **Kundig, T.M., Shahinian, A., Kawai, K., Mittrucker, H.W., Sebzda, E., Bachmann, M.F., Mak, T.W. & Ohashi, P.S.** (1996)
Duration of TCR stimulation determines costimulatory requirement of T cells. *Immunity.*, **5**, 41-52.
- [193] **Cai, Z. & Sprent, J.** (1996)
Influence of antigen dose and costimulation on the primary response of CD8⁺ T cells in vitro. *J Exp Med.*, **183**, 2247-2257.
- [194] **Thomson, C.B., Lindsten, T., Ledbetter, J.A., Kunkel, S.L., Young, H.A., Emerson, S.G., Leiden, J. M. & June, C.H.** (1989)
CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **86**, 1333-1337.
- [195] **Fraser, J.D., Irving, B.A., Crabtree, R.G. & Weiss, A.** (1991)
Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science.*, **251**, 313-316.
- [196] **Diehn, M., Alizadeh, A.A., Rando, O.J., Liu, C.L., Stankunas, K., Botstein, D., Crabtree, G.R. & Brown, P.O.** (2002)
Genomic expression programs and the integration of the CD28 costimulatory signal in T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **99**, 11796-11801.
- [197] **Acuto, O. & Michel, F.** (2003)
CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol.*, **3**, 939-951.
- [198] **Rudd, C.E. & Schneider, H.** (2003)
Unifying concepts in CD28, ICOS and CTLA4 co-receptor signalling. *Nat Rev Immunol.*, **3**, 544-556.
- [199] **Boise, L.H., Minn, A.J., Noel, P.J., June, C.H., Accavitti, M.A., Lindsten, T. & Thomson, C.B.** (1995)
CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity.*, **3**, 87-98.
- [200] **Gritzapis, A.D., Mamalaki, A., Kretsovali, A., Papamatheakis, J., Belimezi, M., Perez, S.A., Baxevanis, C.N. & Pamamichail, M.** (2003)
Redirecting mouse T hybridoma against human breast and ovarian carcinomas: in vivo activity against HER-2/neu expressing cancer cells. *Br J Cancer.*, **88**, 1292-1300.
- [201] **Altenschmidt, U., Klundt, E. & Groner, B.** (1997)
Adoptive transfer of in vitro-targeted, activated T lymphocytes results in total tumor regression. *J Immunol.*, **159**, 5509-5515.
- [202] **Brocker, T.** (2000)
Chimeric Fv- ζ or Fv- ϵ receptors are not sufficient to induce activation or cytokine production in peripheral T cells. *Blood.*, **96**, 1999-2001.
- [203] **Osman, N., Turner, H., Lucas, S., Reif, K. & Cantrell, D.A.** (1996)

The protein interactions of the immunoglobulin receptor family tyrosine-based activation motifs present in the T cell receptor zeta subunits and the CD3 gamma, delta and epsilon chains. *Eur J Immunol.*, **26**, 1063-1068.

[204] Baniyash, M. (2004)

TCR ζ -chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response. *Nature.*, **4**; 675-687.

[205] Healy, C.G., Simons, J.W., Carducci, M.A., DeWeese, T.L., Bartkowski, M., Tong, K.P. & Bolton, W.E. (1998)

Impaired expression and function of signal-transducing zeta chains in peripheral T cells and natural killer cells in patients with prostate cancer. *Cytometry.*, **32**, 109-119.

[206] Matsuda, M., Petersson, M., Lenkei, R., Taupin, J. L., Magnusson, I., Mellstedt, H., Anderson, P. & Kiessling, R. (1995)

Alterations in the signal-transducing molecules of T cells and NK cells in colorectal tumor-infiltrating, gut mucosal and peripheral lymphocytes: correlation with the stage of the disease. *Int J Cancer.*, **61**, 765-772.

[207] Dworacki, G., Meidenbauer, N., Kuss, I., Hoffmann, T.K., Gooding, W., Lotze, M & Whiteside, T.L. (2001)

Decreased zeta chain expression and apoptosis in CD3+ peripheral blood T lymphocytes of patients with melanoma. *Clin Cancer Res.*, **7**, 947-957.

[208] Hirst, W., Buggins, A. & Mufti, G. (2001)

Central role of leukemia-derived factors in the development of leukemia-associated immune dysfunction. *Hematol J.*, **2**, 2-17.

[209] Ueda, Y., Levine, B.L., Huang, M.L., Freeman, G.J., Nadler, L.M., June, C.H. & Ward, S.G. (1995)

Both CD28 ligands CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) activate phosphatidylinositol 3-kinase, and wortmannin reveals heterogeneity in the regulation of T cell IL-2 secretion. *Int Immunol.*, **7**, 957-966.

[210] Hombach, A., Wiczarkowicz, A., Marquardt, T., Heuser, C., Usai, L., Pohl, C., Seliger, B. & Abken, H. (2001)

Tumor-specific T cell activation by recombinant immunoreceptors: CD3 zeta signaling and CD28 costimulation are simultaneously required for efficient IL-2 secretion and can be integrated into one combined CD28/CD3 zeta signaling receptor molecule. *J Immunol.*, **167**, 6123-6131.

[211] Mitsuyasu, R.T., Anton, P.A., Deeks, S.G., Scadden, D.T., Connick, E. Downs, M.T., Bakker, A., Roberts, M.R., June, C.H., Jalali, S., Lin, A.A., Pennathur-Das, R. & Hege, K.M. (2000)

Prolonged survival and tissue trafficking following adoptive transfer of CD4zeta gene-modified autologous CD4(+) and CD8(+) T cells in human immunodeficiency virus-infected subjects. *Blood.*, **96**, 785-793.

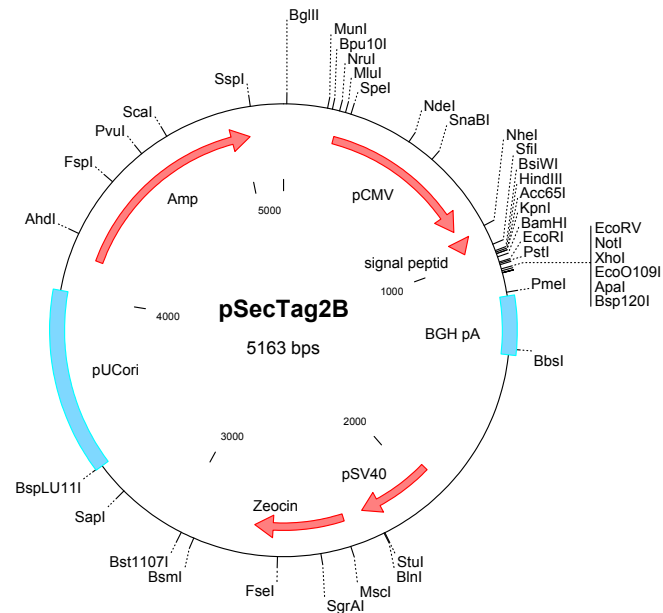
[212] Zhou, P., Lee, J., Moore, P. & Brasky, K.M. (2001)

High-efficiency gene transfer into rhesus macaque primary T lymphocytes by combining 32 degrees C centrifugation and CH-296-coated plates: effect of gene transfer protocol on T cell homing receptor expression. *Hum Gene Ther.*, 12, 1843-1855.

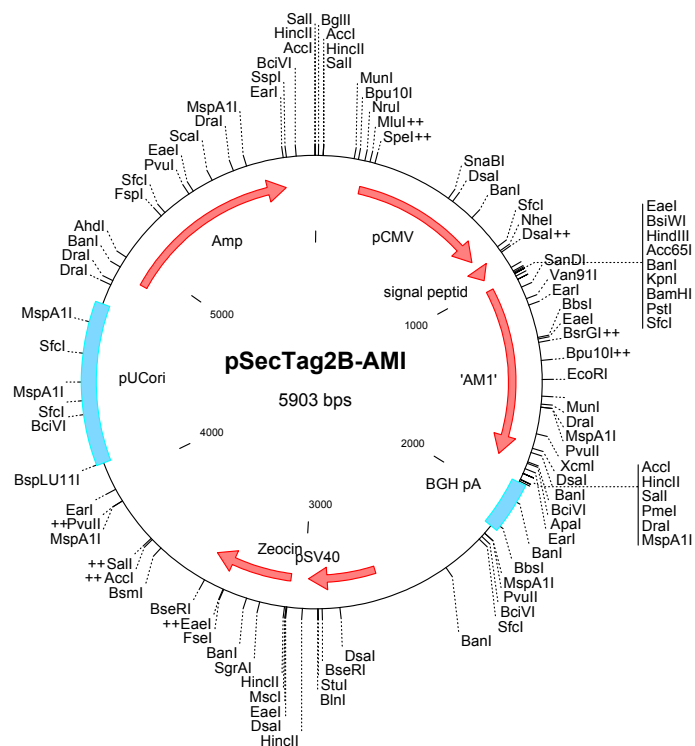
7. Anhang

7.1. Vektorkarten

- pSecTag2B



- pSecTag2B-AMI



7.2. IgBlast Datenbank-Analyse

- IgBlast Datenbank-Analyse mit der schweren variablen Domäne des 7F5 Antikörpers

ID%		-----FWR1-----	
GL			
IF			
	tmpseq_0	2	AGGTGAAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGTTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGATTC 81
93	VH69.1	4	--..... GTN....NN..... 81
91	VH7183.5b	4	--.....GT.....C.....C..... 81
94	VH7183.13	38	-----.....C..... 81
88	DFL16.1		-----
77	DFL16.1j		-----
100	DFL16.2		-----
95	JH1		-----
84	JH4		-----
91	VH50.1	4	--.....GT.....C.....C.A..... 81
90	VH7183.23b	4	--.....GT.....A..C.....A.....C..... 81
90	VH7183.3b	4	--.....GT.....C.....A.....C..... 81
91	VH98-3G	15	-----.....C.....A.....C..... 81
90	VH7183.27b	4	--.....GT.....C.....A.....C..... 81
90	VH7183.9	15	-----.....C.....A.....C..... 81
90	VH283	15	-----.....C.....A.....C..... 81
89	VH7183.21b	4	--.....GT.....C.....A.....C..... 81
89	VH7183.7b	4	--.....GT.....AC.....A.....C..... 81
90	VH7183.10	15	-----.....C.....A..T.....C..... 81
89	3:3.9	2C.....GT.....AC.....A.....C..... 81
89	VH7183.14	4	--.....GT.....C.....A.....C..... 81
90	VH76-1BG	31	-----.....A.....C..... 81

89	VH37.1	4	--.....GT.....C.....A.....C.....	81
89	V-BK	4	--.....GT.....C.....A.....C.....	81
89	VHD6.96	15	-----.....C.....A.....C.....	81
88	VH7183.30b	4	--.....GT.....A.....CA.....C.....	81
89	VH68-5N	31	-----.....C.....	81
89	VH57-1M	31	-----.....A.....C.....	81
86	VH61-1P	15	-----.....C.....G.....C.....	81
87	VH7183.22b	24	-----.....C.....A.....C.....	81
86	VHMOPC21	15	-----.....C.....G.....C.....	81
		82	-----> <-----CDR1-----> <-----FWR2-----> <-----	
		82	ACTTTCAGT TCCTATACCATGTCT TGGGTTCGCCGGACTCCAGAGAAGAGGCTGGAATGGGTCGCA TACATTTCATAATGG	161
93		82AG.....	161
91		82GA....TA....A.	161
94		82AG.....	161
88			-----	
77			-----	
100			-----	
95			-----	
84			-----	
91		82GA....TA....A.	161
90		82AG....G.....	161
90		82AG.....G.....G.....	161
91		82AG....G.....A.T.....G.....	161
90		82AG....GG.....C.....G.....	161
90		82AG....G.....G.....G.....	161
90		82AG.....G.....G.....G.....	161
89		82AG....G.....G.A.....G.....	161
89		82AG....GG.....C.....G.....	161
90		82AG....TA.....G.T.....	161
89		82AG....GG.....C.....G.....	161
89		82	G.....AG....GA.....G.....	161
90		82AG....G.....G.....G.....	161
89		82AG....GG.....G.....G.....	161
89		82AG....G..G.....G.....	161
89		82GA....TA....A.	161
88		82AA....TA.....A.A.....G.....G.....T...	161

89	82	AG....GG.....	A.....C.....	G.T.....	AC....A...G.AA	161
89	82	AG....G.....	A.....	G.....	.C....AG..G...	161
86	82	AG..T.GGA...CAC	T.A.G.....	G.....G.....AG..G...	161
87	82	GA....GGA...CAC	T.A.G.....	G.....G.....T...AG..G...	161
86	82	AG..T.GGA...CAC	T.A.G.....	G.....G.....AG..G...	161
GL ID%			-----CDR2----->					
IF		tmpseq_0	162	TGGTGGTCACACCTACTATCCAGACACCATAAAGGGC		CGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCTGTTCC		241
93		VH69.1	162AG...A.....TG.....	A..		241
91		VH7183.5b	162AG.....T.....TG.....	A..		241
94		VH7183.13	162AG.....TG.....	A..		241
88		DFL16.1		-----		-----		
77		DFL16.1j		-----		-----		
100		DFL16.2		-----		-----		
95		JH1		-----		-----		
84		JH4		-----		-----		
91		VH50.1	162AG.....T.....TG.....	A..		241
90		VH7183.23b	162A.T...T.....G.....TG.G.....	G.....A..		241
90		VH7183.3b	162A.....GTG.G.....T	A..		241
91		VH98-3G	162	...A..T.....TG.G.C....	A..		241
90		VH7183.27b	162	...A..T.....GTG.G....G	A..		241
90		VH7183.9	162	...A..T.....GTG.G....G	A..		241
90		VH283	162A.....GTG.G....T	A....A..		241
89		VH7183.21b	162	...A..T.....ATG.....	A....A..		241
89		VH7183.7b	162	...A..T.....GTG.G....G	A..		241
90		VH7183.10	162AG.....TG.G.....	A..		241
89		3:3.9	162	...A..T.....GTG.G....G	A..		241
89		VH7183.14	162	...A..T.....GTG.G.....	G.....A..		241
90		VH76-1BG	162	...A..T.....GTG.G....G	A..		241
89		VH37.1	162	...A..T.....GTG.G....G	A....A..		241
89		V-BK	162	...A..---.....GTG.G.....	T.....G.....T....A..		238
89		VHD6.96	162	...A..T.....GTG.G....G	A....A..		241
88		VH7183.30b	162T.AG.....T.....ATG.....	G.....T.A..		241
89		VH68-5N	162AG.....T.....GTG.G.....	A..		241
89		VH57-1M	162	...A..---.....GTG.G.....	T.....G.....T....A..		238
86		VH61-1P	162	CA..A..AC..T.....G.....AG.G.....	C.....		241
87		VH7183.22b	162	CA..A..AC..T.....G.....AG.G.....			241
86		VHMOPC21	162	CA..A..AC..CT.C....G.....AG.G.....	C.....		241
				-----FWR3----->				
			242	TGGAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAAGACACGGCCATGTATTACTGTACAAGA		CGAATGTACTACGGTAATAGCCACTGG		321
93			242	..C.....G.....		-----		294
91			242	..C.....C.....G.....A.....G.....		...-----		297

94	242	..C.....G.....G.....	-----	295
88	6	-----	-----.....G....T..---	23
77	6	-----	-----.....A.GG....T..---	23
100	6	-----	-----.....	13
95	3	-----	-----.....	7
84		-----	-----	
91	242	..C.....C.....G.....A.....G.....	-----	295
90	242	..C.....G.....A.....G.....	-----	297
90	242	..C.....G.....G.....G.....	-----	295
91	242	..C.....G.....G.....G.....	-----	293
90	242	..C.....G.....A.....G.....	-----	297
90	242	..C.....G.....G.....G.....	-----	295
90	242	..C.....G.....G.....T.....G.....	-----	294
89	242	..C.....CA.....G.....A.....G.....	-----	297
89	242	..C.....G.....A.....G.....	-----	297
90	242	..C.....G.....A.....T.....G.....	-----	295
89	242	..C.....G.....A.....G.....	-----	294
89	242	..C.....G.....G.....T.....G.....	-----	295
90	242	..C.....G.....G.....G.....	-----	295
89	242	..C.....G.....G.....T.....G.....	-----	295
89	239	..C.....G.....G.....	-----	285
89	242	..C.....G.....A.....G.....	-----	294
88	242	..C.....C.....A.....G.....G.....	-----	297
89	242	..C.....G.....A.....G.....	-----	294
89	239	..C.....G.....G.....G.....	-----	291
86	242	..C.....C.....A.....G.....G.....	-----	294
87	242	..C.....C.....G.....G.....	-----	288
86	242	..C.....C.....A.....G.....G.....	-----	294
GL ID%				
IF	tmpseq 0	322	TACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCTCGGTCACCGTCTCCT	364
93	VH69.1		-----	
91	VH7183.5b		-----	
94	VH7183.13		-----	
88	DFL16.1		-----	
77	DFL16.1j		-----	
100	DFL16.2		-----	
95	JH1	8A.....T.....	50
84	JH4	20	-----.....TCA...A....A.....	51
91	VH50.1		-----	
90	VH7183.23b		-----	
90	VH7183.3b		-----	

91	VH98-3G	-----
90	VH7183.27b	-----
90	VH7183.9	-----
90	VH283	-----
89	VH7183.21b	-----
89	VH7183.7b	-----
90	VH7183.10	-----
89	3:3.9	-----
89	VH7183.14	-----
90	VH76-1BG	-----
89	VH37.1	-----
89	V-BK	-----
89	VHD6.96	-----
88	VH7183.30b	-----
89	VH68-5N	-----
89	VH57-1M	-----
86	VH61-1P	-----
87	VH7183.22b	-----
86	VHMOPC21	-----

- *IgBlast* Datenbank-Analyse mit der leichten variablen Domäne des 7F5 Antikörpers

ID%		<-----FWR1----->		<-----	
GL					
IF					
	tmpseq 0	9	-----GATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGCGACAGAGTCACCATCAATTGC	AGGACAAGCCA	80
92	ce9	1	GATATCCA.....A..A.....A.....G....	...G....T..	80
91	cp9	9	-----.....A..A.....A.....G....	..TG....T..	80
90	cy9		-----	-----	
97	JK1		-----	-----	
85	JK2		-----	-----	
81	cj9	9	-----.....C.....T.A.....A..A.....GTC...C....	C..G....T..	80
88	gj38c	9	-----.....A.....A.....A.G..A.....C....	.A.G.....	80
90	cb9		-----	-----	
90	ba9		-----	-----	
92	cf9		-----	-----	
			----CDR1----->	<-----FWR2----->	<-----CDR2
		81	GGACATTAGCAACTATTTAAAC	TGGTATCAGCTGACACCAGATGGAACGTGTTAAACTCCTGATCTAC	TACACATTAAAAAT 160
92		81T.....A..A.....C..G.. 160
91		81	..G.....T.....A..A.....TC..GT. 160
90		95	-----.....G..A..A....G.....A.....	.C.....CC..T. 160
97			-----	-----	-----
85			-----	-----	-----
81		81CATGGT.....	.T..T....A..A....G..A....A.....A.....T	G.A....CC..T. 160
88		81	A.....	-----	----- 88
90			-----	-----	-----
90			-----	-----	-----
92			-----	-----	-----

GL	ID%		----->	<-----	-----FWR3-----	
IF	tmpseq_0	161	TAAATTCA	GGAGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGATTATTCTCTCACCATTAACAACCTGGAGAAA		240
92	ce9	161	..C.C...A.....G.....C..		240
91	cp9	161	..C.C...C.G.....	----	236
90	cy9	161T	..T.....T.....	-----	224
97	JK1		-----	-----		
85	JK2		-----	-----		
81	cj9	161	..G....T	..T.....AA.....A.....T.....	-----	220
88	gj38c		-----	-----		
90	cb9	172	-----	---.....T....C.....G..A..C.G.....	---	237
90	ba9	172	-----	---.....A.....CA.....C.G..G.....	---	237
92	cf9	169	-----T.....A.....AG.....	-----	224
			----->			
		241	GAGGATTTTGCCACTTATTTTTC	CAACAGAGTAAAACACTTCCGTGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAA		320
92		241	..A...A.....C.....G....T..G.....	-----	284
91			-----	-----		
90			-----	-----		
97		1	-----	-----	35
85		4	-----	-----A..G..G.....A..	35
81			-----	-----		
88			-----	-----		
90			-----	-----		
90			-----	-----		
92			-----	-----		
GL	ID%					
IF	tmpseq_0	321	GCG	323		
92	ce9		---			

91	cp9	---	
90	cy9	---	
97	JK1	36	A.. 38
85	JK2	36	A.. 38
81	cj9	---	
88	gj38c	---	
90	cb9	---	
90	ba9	---	
92	cf9	---	

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Professor Dr. E. Peter Rieber für die Vergabe des interessanten Themas, die vielseitige Unterstützung, den Rückhalt in schwierigen Situationen und die ständige Diskussionsbereitschaft. Durch sein umfangreiches Wissen und sein Engagement war er maßgeblich am Gelingen dieser Arbeit beteiligt. Besonders dankbar bin ich für die wissenschaftliche Freiheit, die er mir immer gewährt hat.

Herrn Professor Dr. Gerhard Rödel danke ich für die Übernahme der offiziellen Betreuung mit allen damit verbundenen Aufgaben, sein Interesse am Fortgang der Arbeit und seine aufmunternden Worte.

Ich bedanke mich bei Dr. Achim Temme für die engagierte Betreuung.

Meinen „Laborfreunden“ Annette, Michael und Nina, die mir über die Zeit besonders an Herz gewachsen sind, kann ich nicht genug danken. Danke für die spannenden wissenschaftlichen Diskussionen und vor allem für die vielen schönen Aktivitäten außerhalb des Laboralltags. Schade, dass wir als Team nicht zusammen bleiben können.

Bei allen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Immunologie möchte ich mich für die herzliche Aufnahme und die große Hilfsbereitschaft im Laboralltag bedanken.

Meiner Familie, ganz besonders meiner Mutter und meinem „kleinem“ Bruder Marcin, danke ich von Herzen für die liebevolle Unterstützung während des gesamten Studiums.

Ich danke dir mein lieber Thomas für deinen treuen Beistand. Ich verdanke dir mehr als ich hier zusammenfassen kann. Du bist ein seltener Glücksfall im Leben. Ich bin froh, dich gefunden zu haben!

Versicherung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Immunologie der Technischen Universität Dresden unter wissenschaftlicher Betreuung von Prof. Dr. med. habil. E. P. Rieber angefertigt.

Die Promotionsordnung wird anerkannt.

Dresden, den 22.09.2005

Agnieszka Morgenroth